1	Úvod	3	
2	Stavba, funkce a aplikace AFM		
	2.1 Stavba AFM	. 5	
	2.2 PRACOVNÍ REŽIMY AFM	8	
	Kontaktní režim (C-AFM)	9	
	Nekontaktní režim (NC-ÁFM)	12	
	Periodický kontaktní režim (TP-AFM)	14	
	2.3 MOŽNOSTI ZOBRAZOVÁNÍ AFM	16	
	2.4 PROSTOROVÉ A VERTIKÁLNÍ ROZLIŠENÍ AFM	17	
	2.5 METODY K UCHYCENÍ BIOLOGICKÝCH VZORKŮ	20	
	2.6 Zobrazování v kapalinách	21	
	2.7 SUBSTRÁTY POUŽÍVANÉ V BIOLOGICKÝCH APLIKACÍCH AFM	23	
	Slída (mica)	24	
	Sklo (cover glass)	27	
	Zlaté vrstvy (thin gold films)	28	
	Křemíkové destičky (silicon wafers)	29	
	Grafit	29	
	Thermanox	30	
	2.8 VYBRANÉ MODIFIKACE SUBSTRÁTŮ	30	
	2.8.1 Modifikace multivalentními kationty	30	
	2.8.2 Použití poly-L-lyzinu	31	
	2.8.3 Modifikace substrátu použitím alkoxysilanů	32	
	Silanizace slídy APTESem	33	
	Silanizace slídy oktadecyltrichlorsilanem, OTS	36	
	Silanizace slídy ostatními používanými silany	37	
	Modifikace AP- slídy glutaraldehydem	37	
	Silanizace skla APTESem	37	
	Silanizace krycího skla ostatními silany	38	
	Silanizace křemíkových destiček alkoxysilany	39	
	2.8.4 Modifikace substrátu použitím Langmuir-Blodgettovy techniky	10	
	29 A DI IKACE A FM	40 43	
	2.) AI LIKACE AI WI 201 Molekulární měření	т <i>3</i> ЛЗ	
	2.9.1 Molecular in mereni	$\frac{1}{4}$	
3	AFM nukleových kyselin	46	
	3.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN PRO AFM ZOBRAZOVÁNÍ.	50	
	Vysušení roztoku DNA na vhodném substrátu	51	
	Slída aktivovaná multivalentními kationty	52	
	Modifikovaná Kleinschmidtova metoda	53	
	Použití LB vrstev při zobrazování nukleových kyselin	55	
	Metody silanizace slídy	58	
	Silanizace slídy použitím silatranu	66	
	Kovalentní uchycení molekul DNA	66	
	Zobrazení chromatinových vláken	67	
	Odlišné metody uchycení DNA k substrátům	68	
	3.2 SHRNUTÍ APLIKACÍ ÁFM PRO STUDIUM NUKLEOVÝCH KYSELIN	70	

Cíle diplomové práce	74			
Experimentální část	75			
5.1 MATERIÁL A METODY	79			
5.1.1 Uprava substrátů	81			
Použití čisté slídy	81			
Slída upravená Mg <sup>2+</sup> kationty				
Slída modifikovaná metodou "liquid APTES"	82			
Slída modifikovaná metodou "neat APTES"	83			
Sklo a slída modifikované metodou "vapour APTES"				
5.2 AFM ZOBRAZOVÁNÍ	85			
5.2.1 Zobrazování v suchém prostředí				
5.2.2 Zobrazování v kapalině				
5.2.3 Analýza naměřených dat				
Výsledky měření				
6.1 AFM snímky slídy aktivované Mg <sup>2+</sup>				
6.2 AFM SNÍMKY SILANIZOVANÉ SLÍDY	94			
Diskuze AFM snímků plazmidové DNA102				
Diskuze AFM snímků thylakoidů116				
Závěr				
Seznam použité literatury				
	<ul> <li>Cíle diplomové práce</li> <li>Experimentální část</li> <li>5.1 MATERIÁL A METODY</li> <li>5.1.1 Úprava substrátů</li> <li>Použití čisté slídy</li> <li>Slída upravená Mg<sup>2+</sup> kationty</li> <li>Slída modifikovaná metodou "liquid APTES"</li> <li>Slída modifikovaná metodou "neat APTES"</li> <li>Sklo a slída modifikované metodou "vapour APTES"</li> <li>Sklo a slída modifikované metodou "vapour APTES"</li> <li>5.2 AFM ZOBRAZOVÁNÍ</li> <li>5.2.1 Zobrazování v suchém prostředí</li> <li>5.2.2 Zobrazování v kapalině</li> <li>5.2.3 Analýza naměřených dat</li> <li>Výsledky měření</li> <li>6.1 AFM SNÍMKY SLÍDY AKTIVOVANÉ MG<sup>2+</sup></li> <li>6.2 AFM SNÍMKY SLÍDY AKTIVOVANÉ MG<sup>2+</sup></li> <li>Diskuze AFM snímků plazmidové DNA</li> <li>Diskuze AFM snímků thylakoidů</li> <li>Závěr</li> <li>Seznam použité literatury</li> </ul>			

# 1 <u>Úvod</u>

Mikroskopie skenující sondou (Scanning Probe Microscopy, SPM) je soubor mikroskopických technik, jejichž základním společným principem je těsné přiblížení měřicí sondy ke vzorku. Získaná informace je však pouze lokální a pro charakterizaci celého povrchu je nutno provádět postupná měření ve více bodech, tj. rastrování povrchu vzorku sondou. Výsledný, postupně sesbíraný soubor dat je konstruován počítačem.

Techniky SPM neslouží pouze k zobrazování, používají se běžně k detekci nejrůznějších vlastností povrchů (elastické, magnetické, třecí, rozložení povrchových nábojů apod.), k modifikaci povrchů, litografickému zpracování či k manipulaci s molekulami i jednotlivými atomy. Různé typy SPM se uplatňují zejména ve fyzice povrchů, v biologii, při studiu nanočástic nebo například při testování integrovaných obvodů.

Mezi další společné rysy těchto technik řadíme zejména rozlišení, které je závislé na několika parametrech, zejména na velikosti skenujicí sondy a typu vzorku. Dále hraje roli různorodost okolního prostředí vzorku, existence pouze lokální interakce, možnost detekce různých vlastností povrchu apod. Z těch méně výhodných vlastností SPM lze uvést obtížnou interpretaci výsledků a velké množství artefaktů vzniklých během skenování.

Jednou z metod, která patří do rodiny SPM mikroskopů je mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy, AFM). Tato metoda nevyžaduje, aby zkoumané vzorky byly vodivé, tak jak je tomu u STM (Scanning Tunneling Microscopy) a proto mohou být zobrazovány vedle vodičů také organické materiály, izolátory, biologické makromolekuly, polymery, keramické látky, skla apod. V závislosti na příslušenství AFM přístroje mohou být tyto materiály zobrazovány ve speciálních prostředích, jako jsou kapaliny, vakuum či za nízkých teplot. Laboratoř AFM při Katedře experimentální fyziky PřF UP Olomouc je kromě standardních analytických režimů mikroskopu Explorer (skenování v suchém prostředí) vybavena také skenery pro analýzu povrchů v kapalném prostředí (liquid scanner). Vzhledem k malým experimentálním zkušenostem při využití těchto skenerů v rámci biologických aplikací bylo hlavním cílem této diplomové práce vypracovat přehled biologických aplikací AFM a ověřit metodiky přípravy vzorků DNA jejich zobrazením mikroskopem Explorer AFM. V rámci biologických aplikací AFM byl také zpracován přehled používaných substrátů k uchycování biologických vzorků a modifikace povrchu těchto substrátů pro dosažení optimálních podmínek při uchycování biologických vzorků.

## 2 Stavba, funkce a aplikace AFM

Mikroskopické metody využívající skenující sondu (Scanning Probe Microscopy, SPM) jsou odvozeny z metody rastrovací tunelové mikroskopie (Scanning Tunneling Microscopy, STM), jejíž počátek je datován k roku 1981. Tato metoda byla vyvinuta v laboratořích IBM v Curychu a její objevitelé Gerd Binnig a Heinrich Rohrer za svůj objev získali o pět let později Nobelovu cenu. Přístroje STM byly první, které poskytovaly obraz skenovaného povrchu s rozlišením na atomární úrovni.

Při STM měřeních se vyskytovaly parazitní síly mezi hrotem a měřeným povrchem, které způsobovaly přitahování či odpuzování skenujícího hrotu a tím měnily skutečnou vzdálenost hrotu od vzorku. Tato parazitní vlastnost se v roce 1986 dočkala svého uplatnění jakožto hlavní měřicí princip v AFM metodě.

#### 2.1 Stavba AFM

Základem měřicí jednotky u rastrovacích mikroskopů je sonda, kterou je skenován povrch vzorku. Získaný signál pak pochází z detekce interakcí mezi touto sondou a zkoumaným povrchem. Prostorová distribuce velikosti signálu měřeného ve skenované oblasti pak poskytuje prostorově závislý signál, který slouží jako základ pro vytvoření trojrozměrného obrazu. V závislosti na typu senzoru a módu, ve kterém daný přístroj pracuje, skeny (obrázky) zobrazují topografii, elektronovou strukturu nebo mechanické, termální či jiné vlastnosti zkoumaného povrchu. Prostorové rozlišení získaných snímků je závislé zejména na měřených vlastnostech a typu interakce mezi sondou a povrchem.

AFM má ve funkci sondy ostrý hrot (angl. tip) upevněný na volném konci pružného nosníku (angl. cantilever) s malou konstantou tuhosti. Mezi nejdůležitější parametry patří poloměr hrotu při jeho vrcholu  $R_c$ , který ovlivňuje maximální rozlišení, jeho délka (10 µm) a štíhlost, která ovlivňuje schopnost zobrazovat ostré hrany a hluboké zářezy. Mezi další důležité parametry hrotu patří chemická a mechanická odolnost. K parametrům nosníku patří jeho rozměry (délka ~ 100 µm, tloušťka ~ 0,5 µm), konstanta tuhosti (rozmezí 0,1–100 N/m.) a rezonanční frekvence. V neposlední řadě je nutno zvažovat způsob upevnění nosníku k mikroskopu. Nosník je vyráběn z čistého křemíku, křemíku s různými příměsemi, oxidu či nitridu křemíku Si0<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Obvykle však bývá hrot i nosník ze stejného materiálu. Hrot mívá různé tvary, nejčastěji pyramidální nebo kuželovitý a bývá velmi ostrý. Poloměr zakřivení hrotu  $R_c$  se pohybuje v rozmezí 10 až 50 nanometrů, pro aplikace s téměř atomárním rozlišením se používají hroty o poloměru křivosti méně než deset nanometrů. Dnes jsou běžně dostupné komerční nosníky s integrovanými hroty, vyráběné polovodičovou technologií. Pro speciální aplikace můžou být hroty vylepšeny malými mikrohroty (na komerční hrot jsou přidány napařením uhlíku) nebo nanotrubičkami (z uhlíku či WS<sub>2</sub>). Také technikou iontového odprašování mohou být vytvořeny hroty s nízkými hodnotami vrcholových úhlů (pod 10 nm).

Pro nosník se ustálily dva typy tvarů: plochý kvádr (křehčí varianta) nebo spojení dvou plochých kvádrů vytvářejících písmeno V (viz obr. 1). Výběr tvaru nosníku se řídí především typem měření (pro C-AFM jsou používány především tvary "V", pro NC-AFM ploché kvádry).



Obr. 1: Tvary nosníků. Tvar "V" (a) a tvar plochého kvádru (b) nosníku, hrot je umístěn kolmo na rovinu nosníku.

V blízkosti vzorku působí na skenující hrot různé druhy sil, především krátkodosahové odpudivé síly elektrostatického původu a síly vyplývající z Pauliho principu a dalekodosahové přitažlivé van der Waalsovy síly (síly dipól-dipólového charakteru). Díky těmto silám dochází v blízkosti povrchu k vychýlení hrotu s nosníkem z rovnovážné polohy a tím k deformaci nosníku (viz obr. 2).



Obr. 2: Schématický nákres interakce mezi hrotem a skenovaným povrchem.

Skenovací systém slouží k vlastnímu posunu hrotu po vzorku, tedy k rastrování povrchu. Jádrem je piezoelektrická keramika, piezokeramika<sup>1</sup>, která se v závislosti na přivedeném napětí V vratně deformuje. Pohyb piezokeramiky je reprodukovatelný a v závislosti na konstrukci piezokeramiky je umožněn pohyb napojeného nosníku v jednotlivých osách *x*, *y*, *z*. Realizovatelné posuny nosníku po ploše vzorku (rovina (x, y)) mohou být menší než 0,1 nm. Pomocí skeneru se tedy sonda přesunuje v rovině vzorku a v každém měřeném bodě je stanoven soubor dat (x, y, V), která jsou následně přidruženým software vyhodnocena.

Méně běžnou variantou v AFM skenovacím systému je pevné uchycení hrotu a umístění vzorku na piezokeramiku.

Jak už bylo řečené dříve, vzájemné silové působení mezi hrotem a povrchem skenovaného vzorku je základem AFM signálu. Toto silové působení způsobuje ohyb nosníku z jeho počáteční polohy, a míra ohybu je detekována. První AFM používaly k detekci ohybu nosníku tunelový proud, nyní jsou však rozšířeny nejrůznější optické metody. Nejčastější je metoda, ve které je laserový paprsek fokusován na konec nosníku a odtud se odráží na fotodiodový detektor rozdělený na čtyři segmenty. V závislosti na odklonu nosníku od počáteční polohy dopadá odražený laserový svazek během skenování nerovnoměrně do kvadrantů fotodetektoru a poměry intenzit světelného svazku v různých kvadrantech jsou zdrojem údajů o vychýlení nosníku (viz obr. 3). Citlivost detekce ohybu nosníku je řádově 10<sup>-2</sup> nm. Méně často používanou metodou je detekce ohybu nosníku založená na principu interference světla, u některých AFM přístrojů se můžeme setkat s nosníky vyrobenými z piezorezistivních látek, kdy ohyb nosníku je detekován na základě změny elektrického odporu.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Piezokeramika je materiál vytvořený spečením zrn nějaké piezoelektrické látky (nejdůležitější má označení PZT a je tvořen tuhým roztokem PbZrO<sub>3</sub> a PbTiO<sub>3</sub>). Vzhledem k zrnitému charakteru materiál po spečení piezoelektrický jev nevykazuje, protože jednotlivá zrna jsou orientována náhodně a jejich účinek se vzájemně ruší. Proto se po výrobě provádí tzv. orientace, při níž se materiál zahřeje na zvýšenou teplotu a vnoří se do elektrického pole vhodného směru. Tato orientace bohužel není trvalá, ale dochází k jejímu poklesu s časem (depolarizaci), zvláště je-li materiál vystaven vyšším teplotám. Na zabránění depolarizace je nejvhodnější pravidelný provoz piezokeramiky, neboť pod pracovním napětím se materiál cyklicky orientuje.



Obr. 3: Schéma detekce ohybu nosníku.

Protože je při AFM měření hrot udržován velmi blízko zobrazovaného povrchu (nm), je velmi náchylný na náhodné změny relativní vzdálenosti, které mohou ovlivnit měření nebo poškodit vzorek či hrot. Z tohoto důvodu je nutno mikroskop vibračně izolovat. Izolace spočívá ve vhodné konstrukci mikroskopu (velká tuhost rámu, snížení efektivní délky rámu), umístění přístroje ve vhodném prostředí (přízemí, sklep) a na vhodnou podložku (těžké mramorové stoly, stoly s pneumatickým tlumením). Při přesných měřeních nelze zanedbat ani vibrace přenášené vzduchem a pro přesná měření je nutné AFM měřicí systém přiklopit speciálním nasazovacím krytem.

Podobně jako vibrace se negativně projevuje i tepelný drift (jednotlivé části mikroskopu mají různou tepelnou roztažnost). Velmi závažná je také změna teploty v průběhu měření (např. vlivem proudění vzduchu). Určitým řešením je volit velké rychlosti skenování, což má za následek zhoršení kvality zobrazení.

## 2.2 Pracovní režimy AFM

Při interakci mezi hrotem a vzorkem se mezi koncovými atomy uplatňují různé druhy sil. Přiblížíme-li k sobě dva atomy na velmi malou vzdálenost (desítky nanometrů), začne mezi nimi působit přitažlivá van der Waalsova síla, která obecně působí mezi dvěma libovolnými atomy bez ohledu na jejich chemickou podstatu či vazbu v látce. Tato síla způsobí, že se atomy (budou-li volné) k sobě dále přiblíží. Po velmi těsném přiblížení (subnanometrové) však začnou působit na atomy další síly, tentokrát odpudivé, které jsou způsobeny překryvem elektronových obalů obou atomů. V určité vzdálenosti  $r_o$  lze najít sílu o nulové hodnotě (viz obr. 4).



Obr. 4: Průběh výsledných sil působících dvěma atomy.

Budeme-li mezi atomy úmyslně udržovat jinou vzdálenost r než  $r_o$ , bude se působící síla snažit atomy buď přiblížit ( $r > r_o$ ), nebo oddálit ( $r < r_o$ ). Měřením této síly pak můžeme určit, jaká je vzdálenost mezi oběma atomy. Uvážíme-li, že jeden z atomů bude patřit vzorku a druhý atom bude tvořit naší sondu, získáme základ pro mikroskopii atomárních sil. Protože z rozdělení silové křivky vyplývá, že jedné síle mohou někdy odpovídat dvě vzdálenosti (viz obr. 4), není závislost<sup>2</sup> F(r) jednoznačná. Abychom tuto nejednoznačnost odstranili, používá se AFM v několika režimech, kontaktním, nekontaktním a poklepovém.

## Kontaktní režim (C-AFM)

Kontaktní režim, zvaný také repulzivní režim, je nejjednodušším a nejstarším způsobem, při kterém se hrot pohybuje přímo v mechanickém kontaktu se vzorkem a mezi hrotem a vzorkem působí odpudivé síly ( $r < r_o$ ).

Na hrot v těsné blízkosti povrchu působí zejména tři hlavní síly.

 Odpudivé síly, vznikající na základě Pauliho vylučovacího principu, který brání tomu, aby elektrony příslušné atomům hrotu měly stejnou vlnovou funkci jako elektrony příslušné atomům vzorku. Rozsah těchto sil je v rozmezí 10<sup>-10</sup>-10<sup>-8</sup>N.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> U AFM měření jde vždy o interakci odehrávající se převážně v ose z kolmé na rovinu (x, y) skenovaného vzorku, proto je lépe psát F(z).

- 2) Přitažlivé van der Waalsovy síly, které mají charakter dipól-dipólové interakce. Tyto síly mají původ v nerovnovážné distribuci náboje elektronů během velmi krátkých okamžiků<sup>3</sup>. Tato nerovnováha dává vzniknout obecně multipólům, které dále indukují podobnou nerovnováhu ve svém okolí. Tyto síly jsou mnohem menší než elektrostatické síly a jsou nezávislé na chemickém složení zobrazovaného povrchu nebo zobrazujícího prostředí (García and Pérez 2002). Rozsah těchto sil je 10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup>N.
- Pružná síla nosníku udržující hrot v kontaktu s povrchem. Tato síla je závislá na míře ohybu a konstantě tuhosti nosníku. Rozsah těchto sil je 10<sup>-9</sup>-10<sup>-8</sup>N (Dietz and Hansma 1992).

Výsledná síla mezi hrotem a vzorkem působící na hrot je odpudivá, repulsivní. Vedle této repulsivní síly se běžně vyskytuje při operaci v C-AFM ještě síla kapilární.

Kapilární síly jsou způsobené kondenzací vodní vrstvy na povrchu vzorku, kdy tato vrstva vytváří meniskus kolem AFM hrotu (při jeho těsném přiblížení k povrchu) a prostřednictvím kapilárních sil jej přitahuje k povrchu vzorku. Pro snížení efektu kapilárních sil, a tím i zvýšení rozlišení AFM snímků, bylo vyvinuto několik experimentálních přístupů. Jedním z nich je preferování EBD hrotů (electron beem deposited "supertips"), které jsou více hydrofobní než klasické nemodifikované Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hroty.

Někteří autoři se rozhodli redukovat okolní relativní vlhkost prostředí, ve kterém se vyskytuje vzorek a skenující sonda tím, že například drží mikroskop se vzorkem v atmosféře suchého dusíku (Bustamante et al. 1992). Snižování relativní vlhkosti prostředí umožňuje použít menší zobrazující síly a tím i snížit pravděpodobnost poškození biologických vzorků během skenování (Yang and Shao 1993, Yang et al. 1996). Jiní autoři eliminovali výskyt rozhraní voda-vzduch, které vytváří vodní meniskus tím, že skenovali vzorek v kapalném prostředí. Nejčastěji používaným zobrazovacím roztokem byl n-propanol (například Hansma et al. 1992a). U biologických vzorků, například DNA, ponoření a zobrazování vzorku v propanolu navíc často zvýšilo adhezi samotného vzorku k povrchu pevného podkladu (Schaper et al. 1994).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Během běžných časových period se jeví rozložení povrchového náboje jako symetrické a celkový povrch se jeví neutrální.

Vedle kapilárních sil bývá u AFM problém s adhezivními silami. Ty jsou způsobeny tím, že při AFM zobrazování se hrot postupně otupuje a u biologických vzorků bývá často kontaminován malými částmi vzorku. Oba tyto efekty mění lokální interakci mezi koncem hrotu a povrchem v integrální, čímž vedou k silnějšímu kontaktu mezi hrotem a vzorkem (a vzrůstu adhezních sil). Tento jev výrazně zhoršuje výsledné rozlišení naskenovaných struktur. Zmíněný problém je nejzřetelnější při AFM zobrazování malých biologických objektů (izolované molekuly), které jsou snadno poškozeny většími skenujícími silami. Při otupení hrotu (a často i při jeho kontaminaci) je jediným řešením použít nové hroty (García and Pérez 2002).

Topografický profil u C-AFM může být generován dvěma různými způsoby. V **módu konstantní výšky** je piezokeramický skener (a tím i hrot) udržován bez pohybu v ose *z*. Když hrot najede na vyvýšeninu na vzorku, je vzorkem odtlačen nahoru a zvětší se ohnutí nosníku. Naopak na prohlubni klesne odpudivá síla a nosník má snahu se narovnat, a proto bude hrot opět přitlačen ke vzorku. Ohnutí nosníku je pak důsledkem interakce mezi povrchem vzorku a hrotem a tato hodnota dává vzniknout topografické informaci.

C-AFM v módu konstantní výšky má následující výhody a nevýhody:

- ✓ Měření je velmi rychlé, protože nosník je malý a rychle reaguje na změny působících sil.
- Maximální rozdíl ve výšce vzorku musí být malý, protože nosník se při velkém ohnutí může zlomit.
- Závislost mezi působící silou a ohnutím nosníku je lineární jen v prvním přiblížení, což snižuje přesnost měření.

V módu konstantní síly, který je v převážné většině používán, jsou nevýhody odstraněny tím, že doplníme systém o zpětnou vazbu. Před začátkem měření je hrot ke vzorku přitlačen tak, aby ohnutí nosníku bylo  $\delta_o$ . Během skenování hrotu po vzorku je porovnáváno okamžité ohnutí  $\delta$  s  $\delta_o$ . Pokud se hodnoty liší, je nosník oddálen od povrchu ( $\delta > \delta_o$ ) nebo snížen ( $\delta < \delta_o$ ) o takovou hodnotu  $\Delta z$ , aby opět platilo  $\delta = \delta_o$ . Pokud je systémem ukládána trojice dat ( $x, y, \Delta z$ ), může být sestaven topografický obraz povrchu. V tomto režimu je měření pomalejší, protože je pohybováno hrotem nahoru a dolů a systém je omezován odezvou zpětné vazby. Protože je ohnutí nosníku konstantní, je konstantní i působící síla a případná nelinarita se neprojeví.

Kontaktní režim je velice snadno interpretovatelný a názorný a je schopen dosáhnout v případě tvrdých vzorků atomárního rozlišení.

U měkkých vzorků je však rozlišení získaných snímků horší, vlivem laterálních sil generovaných bočným pohybem hrotu. Tyto síly umožňují hrotu se vzorkem hýbat, deformovat jej či úplně zničit. Při tzv. "stick-slip" pohybu hrotu způsobeném laterální silou nastává nežádoucí vychýlení nosníku. V případě vratných deformací vzorku může dojít ke zkreslení obrazu, protože atomy těsně pod hrotem jsou "vytlačovány" ze svých rovnovážných poloh. Proto nebývá tento režim v současnosti při biologických aplikacích používán (Zhong et al. 1993; Jalili and Layminarayna et al. 2004).

#### Nekontaktní režim (NC-AFM)

V nekontaktním režimu (NC-AFM) je hrot udržován ve vzdálenosti cca 5 až 15 nm nad povrchem vzorku a k zobrazování jsou využity přitažlivé síly ( $r > r_o$ ), které ohýbají nosník směrem k povrchu vzorku. Protože zde není hrot v mechanickém kontaktu se vzorkem, nemůže docházet k poškození vzorku. Na druhou stranu větší vzdálenost hrotu od vzorku znamená menší hodnotu působící síly, což vede k menšímu ohnutí nosníku a tedy menší citlivosti systému a větší náchylnosti na šum. Aby byl zvýšen odstup signálu od šumu, je používána oscilační metoda.

Volný konec nosníku je nucen kmitat s vysokou frekvencí (cca 100-400 kHz) a je měřena amplituda kmitání volného konce nosníku s hrotem, kdy velikost amplitudy je volena tak, aby se hrot vzorku nedotknul. Závislost amplitudy A na budící frekvenci oscilačních kmitů  $f_{\text{bud}}$ , A=A(f), je označována jako rezonanční křivka (viz obr. 5).



Obr. 5: Tvar rezonanční křivky.

Pokud je kmitající nosník s hrotem v blízkosti povrchu, kde na něj začnou působit síly F(z), pak se tyto síly projeví změnou efektivní tuhosti nosníku, která se promítne do změny rezonanční frekvence a celá rezonanční křivka se posune vlevo nebo vpravo, dle znaménka působící síly. Bude-li nosník nucen kmitat stále se stejnou frekvencí, projeví se posun rezonanční křivky prudkým poklesem amplitudy kmitů A', kdy právě změny této amplitudy jsou použity ke konstrukci obrazu povrchu.

V módu konstantní výšky je opět vertikální poloha nosníku fixována a je měřena změna amplitudy kmitů při pohybu nosníku podél vzorku. V místech, kde je na povrchu vyvýšenina, bude působící síla větší, a proto se rezonanční křivka více posune a výsledná amplituda bude menší. Soubor zaznamenaných dat v každém bodě rastru má podobu trojice (x, y, A). Protože je změna amplitudy úměrná jen derivaci síly (gradientu), je obtížné interpretovat výsledný obraz v pojmech výškových dat. Proto je častěji používán mód konstantní amplitudy, kdy je udržována konstantní amplituda kmitání  $A_0$ , pomocí svislého pohybu nosníku o  $\Delta z$  tak, aby platilo  $A=A_0$ . K sestavení topografie vzorku je použita trojice dat ( $x, y, \Delta z$ ), kde všechny veličiny mají rozměr délky. Přesto i zde se projevuje vliv zmíněné derivace, protože nelze obecně tvrdit, že stejné vzdálenosti hrotu od vzorku odpovídá stejná velikost působící síly.

Bezkontaktní režim je obtížnější na interpretaci i realizaci. Tyto komplikace jsou však vyváženy možností měřit bez poškození i velmi citlivé vzorky, neboť v tomto režimu se nevyskytují odpudivé síly. Další výhodou NC-AFM je, že citlivé vzorky (například křemíkové destičky u nanosoučástek) nejsou kontaminovány během skenování hrotem. Díky tomuto není vzorek hrotem poškozován tak, jak je to často pozorováno u C-AFM.

I když bylo původně předpokládáno, že rozlišení tohoto režimu bude mnohem horší, než u kontaktního režimu, ukázalo se, že za určitých podmínek (vakuum) může režim NC-AFM dosahovat kvalitnějšího zobrazení než kontaktní režim. Nevýhodou této metody je opět citlivost na vrstvičku vody, která se vždy vytváří kondenzací vzdušné vlhkosti. Tato vrstvička vyvíjí na hrot kapilární sílu, která může být značná. Hrot bývá v této vrstvě obvykle zachycen, čímž přestane kmitat a skenovaný obraz je ztracen.

Konečná síla působící mezi hrotem a vzorkem v nekontaktním režimu je velmi malá, obvykle 10-12 nN.

## Periodický kontaktní režim (TP-AFM)

Periodický kontaktní režim (pulzní) – bývá v anglické literatuře zván tapping (TP-AFM) nebo IC-AFM (intermittent). Motivací pro vývin tohoto pracovního režimu je překonání pracovních problémů při zobrazování v nekontaktním režimu a zároveň minimalizace laterálních (příčných) sil mezi vzorkem a hrotem, které ztěžují skenování v kontaktním režimu.

Odstranění problémů s kondenzací vody je dosaženo tím, že je značně zvýšena amplituda kmitů. Oscilační amplituda je v TP-AFM volena v rozsahu 20-100 nm, je tedy mnohem větší než v nekontaktním režimu Nosník má pak dostatek energie k uvolnění se z dosahu kapilárních sil. V TP-AFM již kontrola relativní vlhkosti prostředí není nezbytná, například i biologické vzorky mohou být skenovány opakovaně na vzduchu a bez zřejmého poškození (Bezanilla et al. 1995).

Zvýšená amplituda u TP-AFM vede k tomu, že v oblasti bodu obratu u povrchu vzorku hrot vzorek poklepává. Posunuje-li se hrot v rastru podél vzorku, je po většinu času mimo kontakt se vzorkem, a proto je značně snížena možnost poškození vzorku tažením hrotu po povrchu. Tím, že je hrot občas v kontaktu se vzorkem naopak může dojít ke zvýšení rozlišení v porovnání s bezkontaktním režimem (častý jev při skenování biologických vzorků). K měření jsou opět používány amplitudy kmitů, teoretický rozbor je však složitější. Kromě posuvu rezonanční křivky vlivem změny efektivní tuhosti se na poklesu amplitudy podílí také skutečnost, že dolní část kmitů je "seřezána". Čím blíže je nosník u vzorku, tím větší část je "seříznuta" (viz obr. 6).



Obr. 6: Průběh kmitů při poklepovém režimu. Hrot nemůže dosáhnout dolního bodu obratu a proto budou jeho kmity "seříznuty".

Také v kapalinách se při poklepovém režimu hrot dotýká zobrazovaného povrchu jednou za celý cyklus a změny v amplitudě nosníku způsobené touto interakcí jsou zdrojem informací pro konstrukci obrazu. Experimentálně je zjištěno, že amplituda oscilací klesá, dostane-li se hrot do kontaktu se vzorkem i v případě, kdy je oscilace nosníku silně tlumena viskózním třením v kapalinách (Bustamante and Rivetti 1996). Při zobrazování v kapalinách však musíme brát v úvahu, že efektivní hmotnost nosníku vzroste a proto je nutno nastavit menší rychlost skenování<sup>4</sup>. U TP-AFM v kapalinách je tedy rezonanční frekvence nosníku mnohem nižší než ve vzduchu (díky vzrůstu efektivní hmotnosti) a tím je dán horní limit skenovací rychlosti. Povrch vzorku proto není dostatečně naskenován, pokud rychlost skenování přesáhne maximální teoretickou hodnotu.



a) TP-AFM b) C-AFM

U TP-AFM a NC-AFM lze místo amplitudy sledovat i změnu fázového posuvu, který vzniká mezi signálem, jež nutí nosník kmitat a mezi skutečnými kmity nosníku. Tento **fázový obraz** však nemá souvislost s topografií vzorku, ale může souviset například s materiálovými vlastnostmi vzorku.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Maximální teoretická rychlost skenování závisí na konstantě tuhosti nosníku, efektivní hmotnosti a koeficientu vnitřního tření.

## 2.3 Možnosti zobrazování AFM

AFM metoda je užitečný nástroj používaný v nejrůznějších vědeckých oblastech. Přesto, že přímé měření intermolekulárních sil s atomovým rozlišením nachází široké spektrum uplatnění (v elektronice, u polovodičových materiálů, u polymerů i v biologii), je nejznámější aplikací AFM **získávání topografických informací** zobrazovaného vzorku. Topografické informace lze získat použitím všech tří režimů: C-AFM, NC-AFM i TP-AFM.

Další méně známou aplikací je **měření laterálních sil** v C-AFM režimu. Tyto síly vznikají při tažení hrotu po povrchu vzorku a často jsou způsobeny třením (mohou mít i jiný původ). Pokud studujeme materiál, jehož oblasti mají různý koeficient tření, získáme obraz s materiálovým kontrastem, kdy třecí síly lze určit ze zkrutu nosníku o úhel  $\varphi$ . Protože ideálně je zkrut nosníku nezávislý na jeho ohnutí, lze měřit topografii vzorku a variace koeficientu tření zároveň.

Protože mikroskopii atomárních sil chybí chemická citlivost, tedy schopnost rozlišovat určité prvky či sloučeniny, byla vyvinuta **metoda funkčního mapování**. Ta je založena na možnosti nanést na hrot vhodnou chemickou látku. Při skenování pak může dojít v určitých oblastech vzorku k silnější chemické interakci, než by došlo v případě čistě topografického skenování. Takovým způsobem lze mapovat rozložení určitých chemických skupin na povrchu vzorku. U biologických aplikací lze tímto způsobem sledovat například rozložení receptorů (Kaasgaard et al. 2002).

U NC-AFM a TP-AFM fázového zobrazení je zase možno vizualizovat oblasti vzorku s odlišnou elasticitou nebo hydrofobností. V tomto módu jsou zobrazovány fázové posuny oscilujícího hrotu.

Další z aplikací je například **mikroskopie modulovaných sil** (Force Modulation Microscopy, FMM), která je intenzivně využívána pro charakterizaci mechanických vlastností povrchů. Používána je například k charakterizaci jednotlivých složek u složených materiálů, analýze homogenity polymerů nebo detekci kontaminací během výrobních procesů (Jalili and Layminarayna 2004).

Další aplikací AFM je **proměřování silové křivky** (viz obr. 4) v každém bodě rastru zobrazovaného povrchu.

## 2.4 Prostorové a vertikální rozlišení AFM

V případě klasické optické mikroskopie je definováno pouze jedno rozlišení, a to v rovině obrazu. Oproti tomu má AFM dvě různá, vzájemně nezávislá rozlišení: v rovině skenování vzorku (tedy rovině *x*, *y*) a ve směru kolmém na rovinu vzorku (osa *z*).

Uvažujeme-li **rozlišení v rovině**, pak hodnota tohoto rozlišení závisí převážně na geometrii skenujícího hrotu (viz obr. 8). Geometrie hrotu bývá nečastěji charakterizována hodnotou zakřivení konce hrotu  $R_c$ . Jak ukazuje teoretická linie profilu skenu dvou sférických částic, při skenování hrotem o velké hodnotě poloměru křivosti  $R_c$  (tupým hrotem) je výsledný topografický obraz ořezán o detaily, které je možno získat při skenování hrotem o malé hodnotě poloměru křivosti  $R_c$  (ostrým hrotem).



Obr. 8: Srovnání rozlišení při použití tupého (a) a ostřejšího hrotu (b).

Vertikální rozlišení je závislé převážně na stabilitě skenujícího systému, zejména na izolaci od nežádoucích vibrací hrotu nad povrchem. Zdrojem vibrací může být akustický hluk, vibrace země a termální vibrace. Pro maximální vertikální rozlišení je nezbytné minimalizovat tyto vibrace měřicího zařízení, termální vibrace redukovat nelze.

Co se týká definice rozlišení naskenovaných snímků, stále neexistuje všeobecně přijímaná definice. Určitou aproximací<sup>5</sup> se však můžeme v analogii s rozlišením u světelné mikroskopie dopracovat ke kritériu pro rozlišovací mez:

$$\delta = \sqrt{2R_c} \left(\sqrt{z} + \sqrt{\Delta z + \Delta h}\right)$$
, pro  $\delta > \sqrt{2R_c \Delta h}$ .

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Předpokládáme-li pevný povrch vzorku i hrotu. Ve skutečnosti je rozlišení vždy horší v důsledku poddajnosti vzorku.

Úvaha odvození je ilustrována na obr. 9. Máme-li vzorek skládající se ze dvou špičatých, úzkých<sup>6</sup> a stejně vysokých výběžků (píků) umístěných od sebe o vzdálenost *d* zobrazovaný parabolickým hrotem s poloměrem křivosti  $R_c$ , jsou obrazem vzorku dva obrácené hroty, které vypadají, jako by byly zavěšeny na svém příslušném píku. Mezi obrazy hrotu je prohloubenina o hloubce  $\Delta z$ .



Obr. 9: Schématické znázornění faktorů ovlivňujících výslednou prostorovou rozlišovací mez AFM. Zvýšení výškového rozdílu mezi dvěma píky ( $\Delta h\uparrow$ ) snižuje ( $\Delta z\downarrow$ ) a tím se snižuje i výsledná rozlišovací schopnost(roste rozlišovací mez  $\delta$ ).

- *a)* Zobrazení píků z boku
- b) Vrstevnicové zobrazení píků

V tomto případě by definicí rozlišovací meze  $\delta$  mohla být právě minimální vzdálenost *d*, při které je odpovídající hloubka  $\Delta z$  větší, než velikost šumu přístroje. Tato definice rozlišení pro AFM zobrazování se podobá Rayleighově definici pro rozlišení v optické mikroskopii.

Problém však nastává, pokud tyto dva píky mají různou výšku (viz obr. 9). Jestliže výškový rozdíl mezi zobrazovanými píky  $\Delta h$  vzroste, pak hloubka  $\Delta z$  poklesne. Tedy dva píky, které byly rozlišeny v případě, že měly téměř stejnou výšku, již nemohou být rozlišeny v případě různých výšek.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Zobrazovaná nerovnost (výběžek, pík) je užší než hrot.

Tento příklad názorně ilustruje skutečnost, že rozlišení pro AFM je funkcí výškového rozdílu  $\Delta h$  mezi zobrazovanými sousedními objekty a mělo by být určeno odděleně pro každý zobrazovaný objekt na AFM snímku zvlášť<sup>7</sup>.

Jak bylo zmíněno dříve, tato definice prostorového rozlišení je omezena pro zobrazování neměnných povrchů. Ve skutečnosti se však vzorky (zejména biologické) pod tlakem hrotu různě deformují (v závislosti na své geometrii a elastických vlastnostech) a výsledné rozlišení může být lepší, ale i horší oproti vypočítané teoretické hodnotě (Bustamante and Rivetti 1996).

Obecně také platí, že při vyšší rychlosti skenování (výhodné z důvodů termální stability) má zobrazený povrch nižší prostorové rozlišení. Tento efekt může být redukován nastavením parametrů skenování, ale nemůže být úplně zrušen (Bustamante and Rivetti 1996).

Protože rozlišení bývá běžně stanoveno z nejjemnějších detailů rozlišených na zobrazované struktuře, byly vyvinuty jiné, objektivní parametry, kterými lze charakterizovat zkoumané povrchy. Jedním z nejčastěji používaných je střední kvadratická hodnota odchylky drsnosti<sup>8</sup> povrchu, RMS. Pomocí této statistické veličiny jsou běžně klasifikovány podklady k uchycení biologických vzorků z hlediska své výškové homogennosti. RMS hodnota je počítána příslušným AFM software z naskenovaného snímku se zaokrouhlením na 0,01 nm.

RMS počítaná softwarem je definována jako střední kvadratická odchylka:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N} (z_n - \bar{z})^2}{N - 1}}$$

kde  $z_n$  je výška měřená v jednotlivých bodech rastru,  $\overline{z}$  je střední výška a *n* jsou jednotlivé body v rastru (skenu *NxN* pixelů) (Masens et al. 2000).

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Například při zobrazení píků shodné výšky parabolickým hrotem o  $R_c=10$  nm při detekovatelné hloubce  $\Delta z=0,5$  nm získáme pro minimální rozlišitelnou vzdálenost d=6,4 nm. Bude-li však výškový rozdíl  $\Delta h=2$  nm, pak minimální rozlišitelná vzdálenost má hodnotu 12,5 nm.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Pro potřeby této diplomové práce je pod pojmem drsnost myšlena hodnota  $\overline{z}$ .

## 2.5 Metody k uchycení biologických vzorků

Základem pro AFM skenování různých biologických vzorků je jejich znehybnění prostřednictvím uchycení k pevnému podkladu<sup>9</sup> (substrátu) při současném nepoškození původní aktivity a spojitosti zkoumaného vzorku.

Stručně můžeme metody imobilizace vzorků shrnout takto:

Vysušení roztoku se vzorkem na daném substrátu. Při zobrazování na vzduchu může být vzorek dispergovaný v příslušné kapalině přímo vysušen (stlačený vzduch, proud inertního plynu) nebo je ponechán roztok se vzorkem na vhodném substrátu inkubovat a poté je roztok se vzorkem z povrchu odstraněn opláchnutím a povrch s adsorbovaným vzorkem je vysušen.

Fyzikální **uchycení molekul prostřednictvím adsorpce** zprostředkované elektrostatickou nebo hydrofobní interakcí (nekovalentní uchycení) je další velmi často používanou metodou k uchycení vzorků. Interakce zprostředkující adsorpci vzorku k substrátu mají původ ve van der Waalsových silách, elektrostatické interakci nebo hydratačních a hydrofobních efektech. Adsorpce vzorku na substrát je vcelku komplikovaný proces, který závisí zejména na koncentraci vzorku, jeho čistotě, povrchovém rozložení náboje na substrátu, velikosti a povrchovém náboji vzorku, iontové síle a pH roztoku, ve kterém je vzorek rozpuštěn. Adsorpce může být narušena konformačními změnami vzorku, pohybem podkladu, desorpcí, agregací, denaturací a chemickými reakcemi a samozřejmě také hrotem během skenování. Pro odstranění desorpčního jevu bývá adsorpce bývá jednoduchost metodiky<sup>10</sup>, kdy v převážné většině nepotřebujeme složitě modifikovaný vzorek (Wagner 1998).

Chemické navázání nebo zesítění molekul k povrchu (tedy kovalentní uchycení) je dalším experimentálním přístupem. Tento způsob imobilizace vzorku

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> V odborné literatuře bývá pojem "pevný podklad" nahrazen pojmem "substrát". Také v této diplomové práci má slovo substrát vždy význam pevného podkladu k uchycení vzorku.
<sup>10</sup> Vzorek v odpovídajícím pufrovém roztoku je nanesen na povrch substrátu. Například pro DNA je

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Vzorek v odpovídajícím pufrovém roztoku je nanesen na povrch substrátu. Například pro DNA je vhodná koncentrace v rozmezí  $1-10 \mu g/ml$ . Míra adsorpce je výrazně ovlivněna vlastnostmi použitého pufru (zejména Mg<sup>2+</sup> zvyšuje adsorpci DNA na slídě zatímco monovalentní ionty ji snižují). Pro proteiny je vhodná koncentrace pod 50 nM, v závislosti na typu proteinu. Ve srovnání s DNA je adsorpce proteinů méně závislá na koncentraci a typu solí v pufru. Po skončení inkubace vzorku je povrch substrátu s adsorbovaným vzorkem opláchnut ultračistou vodou (deionizovaná, MilliQ) a osušen proudem plynu. Délka inkubace vzorku na substrátu výrazně ovlivňuje kvalitu uchycení. Dlouhá doba inkubace sice zvyšuje počet uchycených molekul na povrchu, ale také zvyšuje riziko, že jednotlivé molekuly (nebo komplexy molekul) budou ovlivněny interakcí s povrchem. Opláchnutí povrchu substrátu je nezbytné pro odstranění zejména solných složek pufru, které by během vysoušení mohly krystalizovat. Nadměrné či nešetrné opláchnutí může naopak způsobit denaturaci vzorku nebo snížení pokrytí povrchu vzorkem.

zahrnuje vytvoření stabilní kovalentní vazby mezi určitou chemickou skupinou na zobrazované molekule (vzorku) a funkčními skupinami, které jsou vystaveny na povrchu substrátu. Kovalentní vazba k uchycení vzorku je důležitá zejména v případech, kdy má vzorek zvýšenou tendenci k desorpci. Při imobilizaci vzorku prostřednictvím kovalentní vazby je důležité, aby aktivita biomolekuly nebyla ovlivněna chemickou reakcí vazebných skupin a aby byl vlastní imobilizační proces reprodukovatelný.

#### 2.6 Zobrazování v kapalinách

Zobrazování dehydratovaných vzorků na vzduchu pomocí AFM je poměrně jednoduché, což je jeden z důvodů, proč je AFM mikroskopie tak oblíbená a má často dokonce přednost před mikroskopií elektronovou. Výhodou zobrazování na vzduchu je možnost dlouhodobějšího uchování vzorků pro opakované pozorování (Hansma et al. 1999). Nejčastějším problémem při zobrazování na vzduchu je kondenzace vody na povrchu vzorku. Jak již bylo zmíněno dříve, tato vrstva vody velmi znesnadňuje AFM zobrazování. Optimální je zobrazovat vzorky při relativní vlhkosti do 40% (Yang et al. 1996<sup>11</sup> and Grigg et al. 1992 within)

Při AFM zobrazování vzorků v kapalinách sice problém s kondenzací vody odpadá, ale na druhou stranu je mnohem obtížnější dostatečně uchytit studované vzorky k povrchu substrátu. Právě možnost zobrazovat vzorky v kapalném prostředí je jedinečnou výhodou AFM oproti všem ostatním zobrazovacím technikám s vysokým rozlišením.

Nejatraktivnějším důvodem, proč zobrazovat vzorky v kapalinách, je možnost sledovat v reálném čase dynamické strukturní změny u nativních molekul a interakce mezi makromolekulami ve fyziologicky blízkém prostředí co nejbližším fyziologickému stavu. U většiny současných, komerčně dodávaných AFM přístrojů je zobrazování v kapalinách umožněno těsně uzavíratelnou komůrkou (liquid cell), adaptovanou do jádra AFM měřicího systému. Tato komůrka (dle na typu konstrukce) umožňuje snadné zobrazování v kapalinách, kontinuální výměnu zobrazujících kapalin a minimalizuje teplotní nestabilitu přístroje. V závislosti na aplikaci mohou být během skenování do zobrazující kapaliny dodatečně přidány například vazebné proteiny,

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup>Při vyšších hodnotách relativní vlhkosti (50% a více) byly zobrazované molekuly plazmidové DNA (pSK31) poškozeny nebo odstraněny ze skenované oblasti, a to i při použití malých skenujících sil. Poškození a odtržení molekuly DNA od substrátu bylo zkoumáno režimem C-AFM, použité síly byly v rozsahu 7-100 nN a efekt relativní vlhkosti byl vyšetřován pro hodnoty 5% až 50% při 5% krocích.

kofaktory nebo inhibitory.

Metodu AFM je pak možno použít pro studium (vizualizaci) dynamických konformačních změn a interakcí mezi makromolekulami. AFM tak pomáhá objasnit vztah mezi strukturou a funkčním stavem zkoumaných biomolekul. Tyto informace nemohou být získány ani elektronovou mikroskopií ani krystalografií či AFM ve vzduchu, neboť tyto metody poskytují jen statické snímky makromolekul. Nevýhodou AFM zobrazování v kapalinách v souvislosti s rychlostí biologických reakcí je snížená rychlost skenování vzorku. AFM poskytuje jeden sken 1 µm x 1 µm zobrazované oblasti minimálně za 30 s, zatímco většina biologických reakcí se odehrává v časové škále milisekund až sekund (Yang et al. 2003).



Obr. 10: Schéma uspořádání měřicího systému při AFM zobrazování v kapalinách.

Jak už bylo zmíněno dříve, výhodou zobrazování v kapalinách je použití menších zobrazujících sil k získání topografických informací o povrchu skenovaného vzorku. Díky tomu se snižuje při zobrazování v kapalinách deformace biologických vzorků a struktura zobrazovaných měkkých vzorků může být detailněji rozlišena. V neposlední řadě zobrazování v kapalinách umožňuje eliminaci artefaktů vznikajících při oplachování a vysoušení vzorků během imobilizačních procedur (Yang et al. 2003).



Obr. 11: Nákres průtokové kapalné komůrky.

## 2.7 Substráty používané v biologických aplikacích AFM

V posledních patnácti letech se aplikace AFM rozšířily na mnoho různých biologických vzorků, byly studovány nukleové kyseliny, proteiny, lipidy, biomolekulární komplexy, ale i organely a celé buňky.

Stejně jako v případě elektronové mikroskopie, i pro AFM musí být vzorky uchyceny k pevnému podkladu – k substrátu. Ideálně by povrch substrátu měl být atomárně rovný, bez jakýchkoliv nerovností. To umožňuje vyhnout se chybným interpretacím získaných snímků, které mohou být způsobené záměnou povrchových nerovností substrátu za povrchové rysy adsorbovaných makromolekul. Dále musí substrát svými povrchovými vlastnostmi umožnit dostatečně silnou interakci se vzorkem, aby během skenování nebyl vzorek z povrchu substrátu odstraněn skenujícím hrotem.

V některých studiích je ale zároveň potřeba zajistit, aby interakce vzorku se substrátem nebyly až příliš silné, protože v tomto případě může být struktura zobrazované makromolekuly vážně deformována, či mohou způsobit jiný druh artefaktů. Tento poslední požadavek je kritický zejména v dynamických studiích (například při vizualizaci pohybu biomakromolekul, posunu enzymových komplexů po vlákně DNA nebo pulzní aktivity kardiomycet).

Rovnost povrchu substrátu a jeho "biokompatibilita" jsou tedy dva základní požadavky na substrát pro zachování integrity vzorku uchyceného na substrátu.

Na rozdíl od EM a STM metoda AFM nevyžaduje, aby byl podklad pro uchycení vzorků vodivý, čímž se rozšiřuje spektrum použitelných substrátů. V devadesátých letech byly systematicky zkoumány nejrůznější povrchy, zejména křemenný krystal, slída, křemíkové destičky, nitrocelulóza, pyrofosfát olovnatý a titaničitan strontnatý. V dnešní době se mezi nejdůležitější substráty v biologických AFM aplikacích řadí v monovrstvách vytvářené zlaté filmy, vrstevnaté dichalkogenidy přechodných kovů (layered transition metal dichalcogenides, TMDCs), amorfní tenké filmy, křemík, sklo a slída.

Zejména krycí sklíčka a čerstvě odštípnutá slída bývají běžně používána pro adsorpci nejrůznějších makromolekul či organel (s různým stupněm úspěchu) (Shao et al. 1996). Výběr vhodného substrátu pro vzorek se řídí převážně tím, jak bude vzorek k substrátu uchycen (adsorpce, kovalentní vazba, samousazování na van der Waalsovy povrchy nebo Langmuir-Blodgettova technika přípravy substrátů).

Při přípravě AFM vzorků je důležité neopomenout fakt, že všechny povrchy vystavené okolnímu vzduchu jsou velmi rychle pokryty vrstvou organických i anorganických kontaminací, adsorbovaných ze vzduchu. Vrstvy nečistot na vzorku nebo na skenující sondě pak mohou vytvářet artefakty a rušit při skenování. Z těchto důvodů by měl být substrát připravován těsně před nanesením vzorku. Vrstvy organických kontaminací na podkladu nebo na sondě mohou být odstraněny plazmou nebo UV zářením (Hansma et al. 1995, Fang and Hoh 1998), pro odstranění kontaminací ze substrátu jsou používána také různá chemická činidla (viz níže).

Překvapivě i redestilovaná voda je zdrojem organických kontaminací a proto je nutné, aby všechny použité pufry a oplachovací roztoky byly připraveny z ultračisté vody (která obsahuje méně kontaminací než klasická redestilovaná voda). K přípravě roztoků je vhodné použít MilliQ-vodu (voda přečištěná systémem Millipore, nejkvalitnější, ale velmi drahé) nebo deionizovanou vodu (voda přečištěná ionexovými filtry a reverzní osmózou, dostačující pro většinu AFM biologických aplikací). Kvalita vody se obvykle charakterizuje hodnotou měrné vodivosti, resp. odporu. Běžná destilovaná voda má hodnotu  $10^{-1}$  M $\Omega$ .cm, zatímco nejkvalitnější MilliQ voda dosahuje hodnot 18 M $\Omega$ .cm.

#### Slída (mica)

Slída je v biologických aplikacích nejběžněji používaný substrát. Její obliba při přípravě vzorků vychází z dokonalé štěpnosti, založené na vrstevnaté struktuře slídy. Konkrétně jde o paralelně uložené trojvrstvé komplexy vázané prostřednictvím kationtů v mezivrstevních prostorách (nejčastěji K<sup>+</sup>). Tyto mezivrstevní kationty kompenzují záporné náboje vznikající zastupováním zhruba jedné čtvrtiny Si<sup>4+</sup> v tetraedrové síti ionty Al<sup>3+</sup>. Jednotlivé slídové trojvrstvy se na sebe mohou ukládat v různých pozicích, čímž vznikají uspořádané nebo neuspořádané polytypy s monoklinickou nebo trigonální symetrií. Obecný vzorec pro skupinu slíd je  $IM_{2-3}T_4O_{10}A_2$ , viz tab. 1.

Tab. 1: Struktura slíd.

$IM_{2-3}T_4O_{10}A_2$	kde:	$I = K^+, Na^+,$	(mezivrstevní kationty)
		$M = Li^+, Al^{3+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}$	(ve středech oktaedrů)
		$T = Si, Al, Fe^{3+},$	(ve středech tetraedrů)
		$A = OH^-, F^-, \dots$	

V mineralogické literatuře je popsáno kolem 40 druhů slíd, kdy uplatnění v AFM aplikacích má pouze muskovit<sup>12</sup>, K[Al<sub>2</sub>(AlSi<sub>3</sub>)O<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>]. Tato forma slídy poskytuje po odštípnutí svrchních vrstev nejčistší a nejméně kazový povrch. Také v rámci ostatních AFM substrátů je muskovit nejpoužívanější substrát v AFM biologických aplikacích.

Muskovit je nevodivý, vrstevnatý, levný a snadno štěpitelný pinzetou nebo izolepou. V publikacích se můžeme setkat s pojmy "green mica" a "ruby mica". Tyto termíny pouze specifikují barevnost (a tedy původ) konkrétního typu muskovitu. Pro zajímavost uveďme, že zeleně zbarvená slída pochází přednostně z jižní Indie (Madras Andrah), zatímco dočervena zbarvená slída je dodávána ze severní Indie (Bihar).



Obr 12: Chemická struktura muskovitu (Lekka et al 2002).

Vzhledem k různé kvalitě slídy je výhodné řídit se systémem ASTM Standard D-351, kterým dodavatelé klasifikují kvalitu slídy do různých stupňů v závislosti na jejích vlastnostech (např. čistota, tvrdost). Pro AFM aplikace je používána slída kvality grade – V.

 $<sup>^{12}</sup>$  V mineralogické literatuře se můžeme ojediněle setkat s tím, že pod pojmem muskovit je myšlen i odlišný strukturní typ slídy: K[Al<sub>2</sub>(AlSi<sub>3</sub>)O<sub>10</sub>(F)<sub>2</sub>]. Tento typ však není používán v biologických AFM aplikacích a pod pojmem "muscovit mica" je v AFM vždy myšlena struktura slídy K[Al<sub>2</sub>(AlSi<sub>3</sub>)O<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>].

Jako substrát pro AFM vzorky se používají vždy čerstvě připravené štěpné lupeny o velikosti 1 cm x 1 cm (oddělené z bločku slídy vtlačením ostrého konce pinzety, skalpelu nebo žiletky mezi dvě vrstvy, nebo oddělené použitím izolepy). Štěpení muskovitu je preferenčně v rovině obsahující draselné atomy. Vzniklé štěpy jsou průsvitné až průhledné, čiré nebo jen velmi světle zbarvené a skelně lesklé. Mají čistý, atomárně rovný povrch v ploše o lineárním rozměru v jednotkách milimetrů. RMS dsnosti povrchu čerstvě odštěpeného muskovitu je 0,06  $\pm$  0,01 nm (SPI Suplies, USA, Morris VJ, Kirby AR, Guning, AP, Atomic force microscopy for biologist).

Čerstvě nachystaná slída je tedy dostatečně rovná a čistá pro nanesení vzorku, případně pro další zpracování. Z hlediska fixace vzorku na povrch slídy je důležité, že neupravený povrch slídy nese ve vodných roztocích negativní povrchový náboj<sup>13</sup>. Druhou důležitou vlastností z hlediska uchycení vzorku je mírná hydrofobnost slídového povrchu.

Slída byla s úspěchem použita v mnoha AFM studiích, zejména při zobrazování DNA a DNA-proteinových komplexů, proteinových uspořádání (arrays) i neuspořádaně usazených proteinů (Morris VJ, Kirby AR, Guning, AP, Atomic force microscopy for biologist).



Obr. 13: AFM snímek povrchu čerstvě odštípnuté slídy, RMS= 0,07 nm (Ouerghi 2002).

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Je-li slída vystavena okolnímu vzduchu, je ihned pokryta tenkou vrstvičkou vody o tloušťce cca 0,5 nm, ve které disociují povrchové OH skupiny a tím na povrchu slídy vzniká záporný náboj. Tato vodní vrstva dává vzniknout kapilárním silám působících na hrot během skenování (viz dříve).

#### Sklo (cover glass)

Pro uchycení biologických vzorků se kromě slídy používají i běžná krycí skla. Při fixaci vzorku na povrch skla je důležité neopomenout, že neupravený povrch skla nese ve vodných roztocích negativní povrchový náboj a je hydrofilní.

Ať už jsou použita pro modifikaci povrchového náboje před nanesením vzorku, nebo je způsobem uchycení vzorku klasická adsorpce, je zapotřebí vždy povrch krycího skla očistit.

Pro odstranění organických kontaminací je běžně používaná procedura, při které se sklíčko několikrát ponoří do koncentrovaného roztoku HCl/HNO<sub>3</sub>, 3:1 v/v a poté se opláchne ultračistou vodou. Pro odstranění zbytků kyselin je vhodné sklíčko nechat pětkrát po dobu jedné minuty v ultrazvukové lázni (50 kHz) s ultračistou vodou. Po této proceduře má sklo čistý a hladký povrch s RMS cca 0,5 nm.

Jiní autoři doporučují pro odstranění organických kontaminací ponechat sklo po dobu pěti až deseti minut v roztoku ultračisté vody, 25% amonnia a 30% peroxidu vodíku, v/v 5:1:1 při teplotě 70 °C. Poté je opět nutné skla několikrát opláchnout ultračistou vodou (Nogues and Wanunu 2004).

Pro odstranění anorganických kontaminací je dále doporučováno ponechat skla v roztoku roztok ultračisté vody, 37% kyseliny chlorovodíkové a 30% peroxidu vodíku, v/v 5:1:1 při teplotě 70 °C (Nogues and Wanunu 2004). Stejnou funkci splňuje také roztok kyseliny sírové a peroxidu vodíku, který bývá v literatuře nazýván "piraňa roztok". Koncentrace i poměr obou chemikálií se v literatuře různí, někdy je dokonce zaměněna kyselina sírová za kyselinu chlorovodíkovou. Příklad různých roztoků: 70% HCl : 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, v/v 7:3, koncentrovaná H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:32% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v 7:3 (Karrasch et al. 1993), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (koncentrovaná) v objemovém poměru 1:19 (Riener et al. 2003).Pro odstranění silných anorganických kontaminací se doporučuje lázeň používaného skla v chromsírové směsi, což je silně kyselá, extrémně agresivní směs pětiprocentního dvojchromanu draselného v koncentrované kyselině sírové.

Mezi další alternativy očištění povrchů od kontaminací patří například ponoření kontaminovaného substrátu do 20% kyseliny chlorovodíkové v ethanolu, nebo 20% kyseliny sírové. Po této proceduře má substrát hydrofilní vlastnosti (tento postup je běžně doporučován pro sklo, slídu a křemík). Po inkubaci v kyselině (obvykle při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny) může následovat ponoření substrátu do bezvodého acetonu.

Postupy k očištění skla je vhodné aplikovat také k očištění skleněného nádobí, které je používáno při přípravě AFM vzorků. Při některých aplikacích může být pro očištění používaného skleněného nádobí (případně i krycího sklíčka v roli substrátu) dostatečné použít pouze ultrazvukovou lázeň (cca 15–30 minut) s kádinkou obsahující desetiprocentní kyselinu chlorovodíkovou.

Sklo má dostatečně rovný povrch pro zobrazování buněk, či jiných velkých a relativně vysokých vzorků. Kromě buněk bylo na skle zobrazeno také velké množství molekul (tubulin), chromozomy a buněčné organely. Pro zobrazení DNA je sklo obecně příliš nerovné, zvláště zobrazování v kapalinách je velmi obtížné.

#### Zlaté vrstvy (thin gold films)

Zlato snadno váže s vysokou afinitou organické thiolové skupiny či bisulfidy, a proto bývá také často používáno ke kovalentnímu uchycení biologických makromolekul. Dostatečně rovný zlatý substrát (zlato je chemicky inertní vůči kyslíku a stabilní vůči radikálům) lze snadno připravit napařením zlata ve vakuu na sklo, křemík nebo slídu. Takto připravené povrchy však vykazují granulovitou (zrnitou) strukturu. Speciální procedury pro přípravu zlatého povrchu poskytují atomárně rovné oblasti povrchu o velikosti několika mikrometrů Po očištění vykazuje zlatý povrch hydrofilní vlastnosti, RMS bývá v rozmezí 0,2 - 0,5 nm v oblastech o ploše až 25 μm<sup>2</sup> (Wagner 1996).

Příklad postupu při přípravě zlatého filmu na slídě s atomárně rovnými oblastmi o průměru 0,5 - 1,0 μm můžeme najít například v práci Nogues and Wanunu 2004. Metoda zahrnuje napaření tenké vrstvy zlata (thin gold film evaporation) na čerstvě odštípnutou slídu, následuje jednu minutu vyžíhání (annealing) při 650 °C v dusíkové atmosféře. Kvalita vyžíhaných zlatých povrchů byla srovnána s těmi, které byly získány napařením zlata za použití klasické cyklické voltametrie (cyclic voltmetry). RMS nevyžíhaného povrchu byla 7,77 nm, metoda vyžíhání povrchu dávala atomárně rovný povrch s RMS 0,27 nm (Nogues and Wanunu et al. 2004).

Jako substrát byl zlatý povrch použit například při studii DNA-proteinového komplexu v Medalia et al. (2002).



Obr. 14: AFM snímky napařených zlatých zrn na povrchu slídy. a) nevyžíhaný povrch (výškový profil řádku do cca 10 nm) b) vyžíhaný povrch (výškový profil řádku do cca 0,5 nm)

#### Křemíkové destičky (silicon wafers)

Jako substrát pro AFM se také dají využít části křemíkových destiček běžně používaných v polovodičové technologii. Křemíkové destičky jsou velmi dobrým podkladem pro LB filmy a také dobrým substrátem pro uchycení DNA (Hansma et al. 1995). Na povrchu křemíku se vytváří tenká oxidová vrstva, u které můžeme po vystavení destičky kontrolovaným oxidačním procesům dosáhnout atomární rovnosti. Oxidované materiály bývají díky OH skupinám vystaveným na povrchu běžně hydrofilní.

Stejně jako sklo i křemíkové destičky je nutno před použitím očistit. Jednou možností je očištění ultrazvukem nejprve v destilovaném acetonu a poté v ultračisté vodě. Jinou alternativou je ošetření roztokem 95% kyseliny sírové s 30% peroxidem vodíku, v/v 1 : 2 po dobu třiceti minut při 110 °C (Schaper et al. 1993b).

## Grafit

Použití grafitu při aplikacích v AFM je méně časté. Tento substrát se uplatňuje zejména tam, kde jsou vedle AFM měření simultánně prováděna i STM měření, případně u vzorků, jejichž terciální a kvartérní struktura by mohla být ovlivněna interakcemi s hydrofilním povrchem. Povrch grafitu je velmi hydrofobní a vykazuje velké hodnoty RMS.

HOPG (highly ordered pyrolytic graphite, vysoce uspořádaný pyrolytický grafit) je vysoce čistého uhlíku, která je běžně používána v SPM aplikacích pro svůj hladký povrch. HOPG je nepolární a vrstevnatý materiál, takže izolepou či pinzetou lze získat štěp s čistým a rovným, atomárně hladkým povrchem. Dobře pozorovatelná pravidelná atomární struktura s periodou asi 0,24 nm je často využívána i pro kalibraci a testování správné funkce AFM (Frank, Metody analýzy povrchů - iontové, sondové a speciální metody, Academia). Použití HOPG k uchycení biologických vzorků je velmi malé a v současné době je tento substrát využíván pouze k přípravě monovrstev ze samousazujících se organických molekul (self-assembly monolayers of organics molecules) (Wagner 1996).

## Thermanox

Thermanox je prodejní název pro plastový polymer, který byl použit jako substrát při AFM zobrazení buněk. Jeho povrch vykazuje hydrofobní vlastnosti a je snadno komerčně dostupný v podobě krycích "sklíček".

## 2.8 Vybrané modifikace substrátů

Protože sklo i slída mají ve vodných roztocích záporný povrchový náboj a ostatní z uvedených substrátů nebývají dostatečně hladké nebo cenově dostupné, byly pro zesílení adsorpce vzorků se záporným povrchovým nábojem vyvinuty různé chemické metody, které umožňují změnit povrchový náboj výše uvedených substrátů.

#### 2.8.1 Modifikace multivalentními kationty

Nejjednodušší metodou sloužící k zesílení adsorpce záporně nabitých molekul je vystavit povrch slídy nebo skla působení obecně multivalentních molekul a změnit tím distribuci povrchového náboje substrátu. Adsorpce pak může být zesílena nebo pro konkrétní vzorky dokonce zcela specifická. Jednou z nejběžnějších metod je vystavit povrch slídy delší dobu (cca. 12 hodin) působení divalentních iontů (ponechat v roztoku obsahujícím například 1mM roztok NiCl<sub>2</sub>). Nikelnaté kationty snadno nahradí draselné kationty obsažené v povrchové struktuře slídy, čímž pak umožní kovalentní uchycení biomakromolekuly se záporným povrchovým nábojem. Po vyjmutí z roztoku je slída obvykle ponechána v ultrazvuku po dobu deseti minut, nejméně třikrát a pokaždé v novém roztoku ultračisté vody. Ultrazvukování vždy v novém roztoku ultračisté vody slouží k odstranění nadbytečné soli, obsažené v roztocích. Slída je poté usušena, nejlépe

inertním plynem a uchována v evakuovaném exsikátoru, než je použita k uchycení vzorku (Costa et al. 2004).

#### 2.8.2 Použití poly-L-lyzinu

Metodu modifikace skla poly-L-lyzinem<sup>14</sup> můžeme najít například v práci Karrasch et al. (1993). Na kyselinou očištěná krycí skla byl napipetován poly-Llyzinový roztok o koncentraci 10 mg/ml,  $M_r$  1000-4000, po jedné minutě inkubace byla skla opláchnuta ultračistou vodou a nechána uschnout na vzduchu. Na modifikovaném suchém skle byl ponechán patnáct minut při pokojové teplotě proteinový roztok o koncentraci 3 mg/ml. Poté bylo sklo se vzorkem opláchnuto ultračistou vodou a usušeno (Karrasch et al. 1993). Povrch skla modifikovaný polylyzinem se v biologických AFM aplikacích používá dosud. Například Lekka et al. (2002) připravil skleněný povrch nanesením kapky 1% roztoku poly-L-lyzinu na očištěný povrch krycího skla. Roztok byl ponechán na skle pět minut. Následovalo osušení, sklo bylo ponecháno přes noc v boxu plněném filtrovaným vzduchem. RMS skla pokrytého poly-L-lyzinem bylo kolem dvou nanometrů, hloubka poly-lyzinové vrstvy byla 9±2 nm. (Lekka et al. 2002). Přehledná aplikace poly-L-lyzinového (PLL), poly-L-glutamového (PGA) a např. hylauronového (HA) filmu k usnadnění buněčné adsorpce je uvedena v Richert et al. (2004<sup>15</sup>).



Obr. 15: Strukturní vzorec poly-L-lyzinu.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Pod pojmem poly-L-lyzin je v aplikacích AFM myšlen poly-L-lyzin hydrobromidu (viz obr. 15), v tomto případě byl použit poly-L-lyzin o  $M_r$  70-150 kDa.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Při fyziologickém pH (7,4) byly buňky snadno uchyceny k multivrstvě PLL, zatímco u PGA velmi slabě.

Další metodou je navázat na povrch substrátu skupiny s křížovou vazbou (crosslinking). Nejčastěji používanou metodou je silanizace povrchu substrátu prostřednictvím různých alkoxysilanů.

#### 2.8.3 Modifikace substrátu použitím alkoxysilanů

Pro navázání vzorku k povrchu substrátu existují různé reagenty s křížovou vazbou (cross-linking). V AFM mikroskopii je však nejpoužívanější metodou silanizace povrchu substrátu prostřednictvím alkoxysilanů.

Základní složkou silanů je křemík navázaný kyslíkovým můstkem (oxygen bridge) na alkylovou skupinu, tj. SiOR. Silany mají obecně nízkou toxicitu (výjimkou je tetramethoxysilan). Alkylsilanové deriváty můžeme dělit na RSiX<sub>3</sub>, RSiX<sub>2</sub>, RsiX, kde R symbolizuje uhlovodíkový řetězec, který může obsahovat různé funkční skupiny (pyridylovou nebo aminoskupinu), X reprezentuje chlorid (Cl) nebo alkoxy skupiny (methoxy, ethoxy), pak mluvíme o **alkoxysilanech**.

Obecný postup přípravy modifikovaných substrátů spočívá v ponoření substrátu s hydroxylovým povrchem (sklo, slída, křemenné destičky) do roztoku alkoxysilanu a organického rozpouštědla na dobu několika minut. Po vytažení z roztoku je substrát opláchnut v organickém rozpouštědle a destilované vodě a nakonec je usušen v proudu inertního plynu.

Během adsorpce molekul silanu na povrch substrátu reagují Si-X vazby s OH skupinami na povrchu substrátu a s malým množstvím vody přítomné na hydrofilním povrchu substrátu. Tímto vzniká síť Si-O-Si vazeb, čímž je vytvořena polysiloxanová monovrstva, ve které jsou molekuly mezi sebou navázány silnou chemickou vazbou a zároveň navázány toutéž silnou vazbou k povrchu substrátu (viz obr. 16). Substrát je po silanizaci výrazně hydrofobní, i když původně vykazoval hydrofilní vlastnosti. Silanové multivrstvy mají využití například v molekulární elektronice a používají se rovněž jako adhezní vrstvy v různých aplikacích (Tenké polymerní vrstvy a povrchy polymerů, internetová verze skript).



Obr. 16: Schéma modifikovaného povrchu substrátu.

Při modifikaci substrátů pro uchycení biologických vzorků je nejčastěji používaným alkoxysilanem 3-aminopropyltriethoxysilan, APTES (viz obr. 17).Z hlediska fixace vzorků se záporným povrchovým nábojem je důležité, že APTES protonuje za neutrálního pH. Křemíková skupina v APTESu je velmi reaktivní a silanizuje povrch substrátu vytvářením kovalentních vazeb s atomy substrátu.

$$\begin{array}{c} \mathsf{OCH}_2\mathsf{CH}_3\\ \mathsf{H}_3\mathsf{CH}_2\mathsf{O} - \overset{|}{\underset{\mathsf{Si}}{\mathsf{Si}}} - \mathsf{CH}_2\mathsf{CH}_2\mathsf{CH}_2\mathsf{NH}_2\\ \overset{|}{\underset{\mathsf{OCH}_2\mathsf{CH}_3}{\mathsf{H}_3}} \end{array}$$

Obr. 17: 3-aminopropyltriethoxysilan, APTES.

## Silanizace slídy APTESem

APTESem silanizovaná slída, tzv. AP-slída (AP-mica), má na povrchu ve vodných roztocích protonované aminoskupiny. Aminoskupiny mají pK=10,6 a i přesto, že se natěsnání aminoskupin na AP-slídě s klesajícím pH snižuje, povrch silanizované slídy bude mít v roztocích o neutrálním pH stále kladný náboj, což je rozhodující při uchycení vzorků se záporným povrchovým nábojem (nukleových kyselin). Navázání silanu lze uskutečnit buď ponořením slídy do roztoku APTESu v rozpouštědle ("liquid APTES") nebo vystavením slídy APTESovým parám ("vapour APTES").

"Liquid APTES" je tedy metoda, při které je substrát modifikován ponořením do roztoku APTESu v organickém rozpouštědle nebo vodě. Proces povrchové modifikace za použití silanizační reakce je velmi složitý a experimentální parametry jako doba reakce, teplota, koncentrace a kvalita silanu ovlivňují reaktivitu silanové molekuly k povrchu substrátu. Při procesu silanizace je nezbytné dodržet čistotu skla, ve kterém je silanizační roztok.

Reakce mezi alkoxysilanem a pevným povrchem je několikastupňovým procesem. V jedné ze silanizačních metod bylo použito kyselého vodného prostředí k uchycení APTESu na pevný povrch. V tomto prostředí APTES hydrolyzuje, přičemž dochází k odštěpení alkoxyskupiny APTESu. Poté následuje kondenzační reakce, při které vzniká silanový polymer<sup>16</sup> (viz obr. 18). V druhém kroku se polymery spojují se substrátem prostřednictvím kovalentní vazby přes hydroxylovou skupinou (-OH) vystavenou na povrchu slídy, viz obr. 19 (Yamaura et al. 2004).

$$2 \text{ NH}_{2} \text{ Si} (OC_{2}H_{5})_{3} \xrightarrow{H_{2}O}_{H^{+}} HO \xrightarrow{NH_{2}}_{I_{1}} \left\{ \begin{array}{c} NH_{2} \\ Si = O - Si = O - Fi \\ Si = O - Si = O - Fi \\ OH \\ OH \end{array} \right\} \xrightarrow{NH_{2}}_{OH} 2 C_{2}H_{5}OH + H_{2}O$$

Obr. 18: Zjednodušená reakce hydrolýzy a kondenzace APTESu s produkty polymerizace.



Obr. 19: Schéma silanizační reakce na povrchu slídy, skla nebo křemíku.

Tento základní silanizační proces může být různým způsobem modifikován. Příkladem modifikace metody "liquid APTES" může být například postup, ve kterém je roztok APTESu připraven naředěním s destilovanou deionizovanou vodou (DDW) (Hu et al. 1996).

 $<sup>^{16}</sup>$  Alkoxylová skupina (-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) je nahrazena hydroxylovou skupinou (-OH) a kondenzací reaktivních křemíkových skupin vzniká vazba (Si-O-Si), přičemž alkohol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) a voda jsou produkty kondenzace.

Objemová koncentrace APTESu ve vodném roztoku byla jednoprocentní, roztok byl přefiltrován přes 2 µm celulózový filtr (cellulose acetate syringe filter). Čerstvá slída byla ponořena do APTES roztoku na pět minut a poté omyta destilovanou deionizovanou vodou (DDW). Takto připravený povrch slídy byl použit k adsorpci DNA<sup>17</sup>. Vzniklá vrstva APTESu měla tloušťku 0,5 - 0,8 nm, RMS takto modifikované slídy byla 0,3 nm v ploše o lineárním rozměru několika mikrometrů (Hu et al. 1996). Další variace metody "liquid APTES" jsou podrobněji rozepsány v kapitole 3.1 Příprava vzorků nukleových kyselin pro AFM zobrazování.

Metodou "**vapour APTES**" lze také modifikovat jakýkoliv pevný substrát, který má na povrchu hydroxylové skupiny. Základem této metody je vložení čerstvých štěpů slídy do uzavřeného objemu obsahujícího APTESové páry.

V práci Bezanilla et al. (1995) byla AP-slída připravena inkubací čerstvě odštěpené slídy ve dvoulitrovém exsikátoru, který obsahoval 30-100 µl 98% APTESu. Po dvou hodinách byla slída vyjmuta a uložena v argonové atmosféře, dokud nebyla použita k nanesení vzorku. AP-slída vydrží aktivní přibližně po dobu jednoho měsíce, je-li uchována v argonové atmosféře. Nejlepší povrchy byly získány při použití 30 µl APTESu (redestilovaného v argonové atmosféře a uchovaného v argonové atmosféře) v případě, že silanizační proces proběhl v exsikátoru plněném argonem. Povrch silanizované slídy je více hydrofobní než "neupravená" slída, pravděpodobně v důsledku propylového řetězce, který váže aminovou skupinu k povrchu (Bezanilla et al. 1995).

Modifikací této metody je napuštění argonu do exsikátoru ještě před vložením mikrozkumavky s APTESem, a přidání N,N'-diisopropylaminu v mikrozkumavce k APTESu do exsikátoru (Wang et al. 2002). Napouštění argonu do exsikátoru probíhalo po dobu dvou minut před vložením chemikálií a také vždy mezi jednotlivými kroky, kdy jsou do exsikátoru vkládány chemikálie a slída (Wang et al. 2002).

Doba, po kterou je povrch slídy vystaven APTESovým parám, se v jednotlivých experimentech u různých autorů liší, od třiceti minut až po dobu dvou hodin. Byla-li doba silanizace delší než dvě hodiny, povrch slídy vykazoval velké hodnoty RMS.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> 1µl roztoku DNA o koncentraci 1 ng/ml v DDW byl napipetován na očištěné krycí sklíčko, které bylo poté shora přiklopeno na modifikovaný slídový povrch. Kapka s DNA na krycím sklíčku ihned pokryla celý povrch slídy. Po několika minutách bylo krycí sklíčko odstraněno, povrch AP-slídy byl opláchnut DDW a osušen stlačeným vzduchem nebo dusíkem.

Jinou variantu metody "vapour APTES" prezentoval ve své práci Xiao et al. (2003). Základem metody je uchycení několika čerstvých slídových štěpů na pevný podklad (plastovou desku) pomocí izolepy nebo lepidla. V práci Xiao et al. 2003 bylo použito 5 ml APTESu (98 %, Sigma) a 5 ml N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilanu (98 %, Sigma). Oba silanové reagenty byly dány každý zvlášť do plastové lahve o objemu 20 ml (každá chemikálie do jedné lahve). Ústí lahve bylo přiklopeno plastovou deskou s nalepenou slídou tak, že povrch slídy byl vystaven silanovým parám uvnitř lahve. Plastová deska se slídou byla umístěna ve výšce pěti centimetrů nad povrchem silanové kapaliny. Plastová láhev byla dána se svou pokrývkou do exsikátoru, opět každá zvlášť. Oba exsikátoru byl přibližně 20 Torr (tj. 2,6.10<sup>3</sup> Pa). Substráty byly ponechány v evakuovaném exsikátoru pět hodin při pokojové teplotě. Poté byly opláchnuty suchým toluenem a ethanolem, tři minuty každý. Následně byly modifikované substráty ponechány tři hodiny v pícce při 120 °C. Takto připravené slídové substráty byly použity k adsorpci DNA<sup>18</sup> (Xiao et al. 2003).

APTES použitý k silanizaci (ať už vapour nebo liquid metodou) byl použit přímo od dodavatele, nebo redestilovaný. Destilace neměla na silanizační proces efekt, pokud použitý silan nebyl starší než dva měsíce nebo pokud nebyl vystaven okolnímu vzduchu po dobu několika hodin (Wang et al. 2002, Bezanilla et al. 1995).

#### Silanizace slídy oktadecyltrichlorsilanem, OTS

Tento způsob silanizace substrátu použil ve své práci Weisenhorn et al. (1991). Čerstvě odštípnutá slída byla dána do pícky na jednu hodinu při 60 °C. Poté byla ponořena do roztoku získaného rozpuštěním 0,1 ml OTS ( $n-C_{18}H_{37}SiCl_3$ ) ve 100 ml rozpouštědla (80 % hexadecane [ $C_{16}H_{34}$ ], 12 % carbon tetrachloride [ $CCl_4$ ], 8 % chloroform [ $CHCl_3$ ]). Po jedné minutě inkubace byla slída z roztoku vyjmuta a opláchnuta jemně chloroformem a ponechána zahřát na 120 °C (Weisenhorn et al. 1991). Takto vytvořený silanový povrch může být dále využit například jako substrát pro LB vrstvy.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> λ-DNA (48 kpb) byla rozpuštěna v deionizované vodě (18 MΩ.cm) na koncentraci 50  $\mu$ g/ml. 5 $\mu$ l DNA roztoku bylo ponecháno inkubovat na AP-slídě pět minut, poté byly substráty opláchnuty třicet sekund tekoucí deionizovanou vodou a osušeny dusíkem. Vzorky byly před zobrazením uchovány v exsikátoru (Xiao et al. 2003).
### Silanizace slídy ostatními používanými silany

Mezi ostatní používané silanizační reagenty v biologických AFM aplikacích patří: methyltrimethoxysilan, methyltriethoxysilan, methoxytrimethylsilan, ethoxytrimethylsilan, 3-aminopropyltrimethoxysilan, butyltrimethoxysilan, phenyltrimethoxysilnan a 3-phenylaminopropyltrimethoxysilan. V práci (Sasou et al. 2003) byl silanizační proces výše uvedenými silany založen na "vapour metodě".

### Modifikace AP- slídy glutaraldehydem

Při modifikaci silanizované slídy byl používán tento postup:

- (1) Pro APTES modifikaci byl exsikátor pročišťován argonem po dobu dvou minut. Poté byla na dno exsikátoru vložena jedna mikrozkumavka s 30 µl APTESu (99 %, Sigma) a jedna mikrozkumavka s 10 µl N,N-diisopropylenethylaminu. Exsikátor byl pět dvě minuty plněn argonem. Čerstvá slída byla vložena do exsikátoru a exsikátor byl plněn argonem další tři minuty. Slída byla vystavena APTES parám po dobu od třiceti minut do doby dvou hodin. Poté byla vyjmuta a ihned použita pro glutaraldehydovou modifikaci.
- (2) Postup glutaraldehydové modifikace je následující: 200 μl 1 mM glutaraldehydu (grade I) bylo napipetováno na povrch AP-slídy ihned po jejím vyjmutí z exsikátoru, doba inkubace byla deset minut. Po modifikaci byl povrch opáchnut ultračistou vodou a použit k uchycení chromatinu (Wang et al. 2002). Struktura modifikované slídy (GD-slída) je na obr. 20.



Obr. 20: Schéma fixace glutaraldehydu na silanizovanou slídu, aldehydová skupina reaguje s lysinovým koncem uchycovaného proteinu.

### Silanizace skla APTESem

APTES se dá využít i k modifikaci krycích sklíček, Karrasch et al. (1993) ve své práci použil metodu "liquid APTES". Silanizace krycích sklíček roztokem APTESu proběhla v Petriho miskách, předem umytých v "piraňa roztoku", tj. 3,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 18 M

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a opláchnutých ultračistou vodou a acetonem. Krycí sklíčka byla jednou omyta koncentrovanou HCl/HNO<sub>3</sub> (3:1) a poté pětkrát opláchnuta v ultrazvukové lázni (50 kHz) v ultračisté vodě. Poté byla ponechána v kyselině trifluoroctové po dobu devadesáti minut a uchována v evakuovaném exsikátoru plněném pevným KOH nejméně po dobu nejméně deseti hodin. Vlastní silanizace proběhla tak, že potřebné množství dvouprocentního roztoku APTESu v 95% vodném acetonu bylo napipetováno do Petriho misek. Skla byla ponořena v tomto roztoku po dobu tří minut. Následovalo jejich opláchnutí acetonem (dvanáctkrát, pět minut každé) Pro upevnění silanových molekul byla sklíčka ponechána v pícce po dobu jedné hodiny při 110 °C (Karrasch et al. 1993).

### Silanizace krycího skla ostatními silany

### Dichlormethylsilan

Očištěná krycí sklíčka byla ponechána v parách dichlormethylsilanu (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiCl<sub>2</sub> v rozmezí tří sekund až pěti minut. Sklíčka byla upevněna k ústí nádoby obsahující silan. Po proběhnutí reakce byla skla umyta ethanolem. Silanizovaný povrch měl mnohem větší RMS než čisté sklo (JPK instrument, Eschrich et al. 1998)

## OTS

Krycí skla (Fiser Scientific, RMS=0,1 nm, měřeno AFM) byla ponechána v koncentrovaném NH<sub>4</sub>OH po dobu jedné hodiny, omyta pětkrát v ultrazvuku v ultračisté vodě. Poté byla sušena po dobu jedné hodiny při 140 °C a ihned ponořena do methanolu, aby na povrchu nebyly molekuly vody a jiné adsorbenty. Povrch skla (i nosníku s hrotem pokrytým SiO<sub>2</sub>) byl silanizován v 5 mM OTS roztoku v heptanu po dobu 24 hodin. Silanizovaný povrch byl poté omyt třikrát heptanem, aby byly odstraněny neuchycené silanové molekuly. Takto ošetřený povrch byl poté ponechán péct po dobu jedné hodiny při 70 °C. Poté byla skla ponořena do acetonu k odstranění neuchycených molekul a uchována v methanolu, dokud nebyla použita k nanesení vzorku (JPK instrument, Wenzler et al. 1997).

### Silanizace křemíkových destiček alkoxysilany

Möller et al. (2000) použili k přípravě silanizovaného povrchu klasickou "liquid" metodu silanizace APTESem. Čerstvě připravené křemíkové štěpy byly ponořeny na 15 minut v jednoprocentním roztoku aminopropyltriethoxysilanu v 95% vodném acetonu. Křemíková destička byla poté opláchnuta v acetonu (pětkrát pět minut každá) a sušena po dobu 45 minut v pícce při 110 °C. Následně byly destičky ponechány po dobu dvou hodin v 0,2% roztoku 1,4-phenylenediisothiocyanate v 10% pyridin/dimethyl formamide. Následovalo omytí methanolem a acetonem. Autoři udávají, že takto aktivované křemíkové štěpy mohou být skladovány v evakuovaném exsikátoru plněném vysoušedlem (chloridem vápenatým) po dobu několika týdnů bez ztráty aktivity (Möller et al. 2000).

3'-Modifikací této metody ie záměna **APTESu** za GOPS. glycidoxypropyltrimethoxysilan. Křemíkové štěpy byly ponořeny v 1% roztoku GOPS v suchém toluenu při teplotě 80 °C na 4 až 6 hodin. Poté byly lehce opláchnuty variantou této metody je záměna APTESu za ethylacetate. Další 3'mercaptopropyltrimethoxysilan. Křemíkové štěpy byly ponořeny v 1% roztoku merkaptosilanu v destilovaném toluenu po dobu 6-8 hodin při 80 °C. Poté byly opláchnuty toluenem, methanolem a deionizovanou vodou a okamžitě použity k inkubaci vzorku (Möller et al. 2000).

Další z variant silanizace je vytvoření samouspořádaných noktadecyltrichlorsilanových monovrstev (SAM) na křemíkovém povrchu. Noktadecyltrichlorsilan, H-((CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-SiCl<sub>3</sub>, OTS, je jedním ze silanů často používaných k modifikaci čerstvé slídy a křemíkových destiček. Jednou z metod jeho použití je právě vytvoření samouspořádaných organických monovrstev (self assembled monolayers, SAM) na povrchu daného substrátu (Goldmann et al. 1998).

# 2.8.4 Modifikace substrátu použitím Langmuir-Blodgettovy techniky přípravy tenkých filmů

Langmuirova vrstva je pojem používaný pro označení dvourozměrné uspořádané molekulární vrstvy na rozhraní voda-vzduch, Langmuir-Blodgettovou vrstvou (LB-vrstva) se rozumí monovrstva, nebo multivrstva přenesená z rozhraní voda vzduch (obecně kapalina – plyn) na pevnou podložku. Princip techniky spočívá v tom, že na vodní hladinu kápneme roztok amfifilních<sup>19</sup> molekul ve vhodném rozpouštědle. Po odpaření rozpouštědla zůstane na rozhraní voda-vzduch monovrstva částečně orientovaných molekul. Stlačením molekulového filmu podle vodní hladiny bariérou (viz obr. 21) dojde ke zkoncentrování molekul a zároveň k jejich uspořádání. Takto připravenou vrstvu lze nabrat na pevnou podložku. Blodgettová s Langmuirem v roce 1937 ukázali, že monovrstvu amfifilních molekul lze přenést z vodní hladiny na vertikálně umístěnou a v tomto směru postupně zvedanou podložku. Takto vzniklé vrstvy se nazývají Langmuir-Blodgettovy vrstvy (LB vrstvy).

Rychlost zvedání podložky pro kvalitní LB vrstvy by měla být menší než 1 mm.s<sup>-1</sup>. Kvalitu LB vrstev ovlivňuje kromě rychlosti zvedání substrátu i typ rozpouštěla a druh amfifilní molekuly.



Obr. 21: Schéma vytváření lipidových multivrstev LB technikou.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Amfifilní molekula má jeden konec hydrofilní a tedy preferenčně ponořený do vody a druhý konec hydrofobní v našem případě umístěný na vzduchu. Mezi nejčastěji používané amfifilní molekuly patří lipidy.

K vytvoření lázně je používána nejčastěji voda, v jiných než AFM aplikacích také rtuť a glycerín. Hydrofilní substráty jsou sklo, křemen, hliník, chrom, křemík (wafer), zlato ve formě napařené vrstvy, stříbro ve formě napařené vrstvy a štípaná slída. Mezi nejpoužívanější hydrofobní substráty patří křemíkové, skleněné či slídové podložky povrchově upravené silanizačním činidlem (trimethylchlorsilan (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl, dimethyldichlorsilan (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiCl<sub>2</sub>, oktadekatrichlorsilan C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>SiCl<sub>3</sub>). Použitá voda musí být velmi čistá, nejlépe je použít deionizovanou vodu, která se dále filtruje pro odstranění pevných částice. Pro odstranění organických nečistot se používají aktivní uhlíkové filtry, v poslední fázi čištění také filtr k odstranění bakterií.

Podle orientace jednotlivých vrstev molekul jsou rozlišovány tři typy multivrstev - X, Y, Z (viz obr. 22). Multivrstva typu Y je běžná pro amfifilní molekuly, jejichž hlavní skupina je vysoce hydrofilní (COOH, H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>) a chvost tvoří alkylový řetězec a je připravená střídavým ponořením a vynořením substrátu přes rozhraní. Multivrstvy typu X jsou připravené opakovaným ponořením a multivrstvy typu Z opakovaným vynořením. Tyto multivrstvy lze vytvořit, jestliže hlavní skupina není příliš hydrofilní (například COOMe), nebo je alkylový řetězec ukončen slabou polární skupinou (například NO<sub>2</sub>). Tyto multivrstvy jsou méně stabilní než typ Y.







Obr. 22: Typy uspořádání LB multivrstev.

Lipidový povrch připravený LB technikou je dostatečně pevný a zároveň hladký s velmi malými vertikálními změnami, je proto vhodný jako substrát k uchycení vzorků pro AFM zobrazování. Použitím vhodného typu lipidů lze lehce dosáhnout požadovaného povrchového náboje vrstvy a tím uchytit biomolekuly prostřednictvím elektrostatické síly. Do lipidové vrstvy také můžeme snadno inkorporovat vybrané proteiny, či konkrétní lipidy, které poskytují selektivní vazebná místa pro uchycení zkoumaných biomolekul. Tím dosáhneme imobilizace vzorku prostřednictvím kovalentní vazby. LB vrstvy mají praktické uplatnění při studiu umělých lipidových

membrán. Vybrané aplikace LB vrstev v AFM mikroskopii jsou uvedeny například v Weisenhorn et al. 1990, Weisenhorn et al. 1991, Schaper et al. 1993b, Mou et al. 1995, Takamoto et al. 2001, Pignataro et al. 2002, Martín et al. 2004).

AFM zobrazuje LB vrstvy přímo, bez artefaktů, ve vzduchu i v kapalinách, s molekulárním rozlišením. Při zobrazování LB lipidových vrstev nebývají problémy s destrukcí vzorku, měřicí síly v C-AFM bývají kolem 10 nN. Za pokojových teplot je tepelný drift lipidů v AFM aplikacích zanedbatelný.

## 2.9 Aplikace AFM

Během posledních patnácti let se mikroskopie atomárních sil rozšířila do mnoha vědních aplikací a stala velmi často používanou metodou dokonce i v biologických oborech. Vzhledem ke své současné rozšířenosti již pomalu umožňuje vzniknout novému vědnímu oboru, biologii povrchů, "surface biology".

Přes tyto různorodé aplikace můžeme AFM aplikace zhruba do dvou základních kategorií (1) molekulární měření a (2) aplikace v biologických oborech

### 2.9.1 Molekulární měření

Tato oblast zahrnuje technické aplikace AFM a pokrývá nejrůznější výrobní oblasti jako je testování elektronických součástek či výroba miniaturních mechanických součástí. Stručně můžeme zmínit několik dominantních okruhů:

- Zobrazování materiálových vlastností je velmi důležitá oblast aplikací AFM. Spolehlivé měření mikrostrukturálních parametrů v nanometrovém rozsahu hraje důležitou roli při vývoji nových slitin a pro stanovení kontrolní kvality ve výrobních procesech. AFM se osvědčuje jako zobrazující i měřicí přístroj, který kombinuje nebo přímo nahrazuje klasické mikroskopické přístroje a navíc přidává 3D měření zkoumaných povrchů. Obvykle není předem nutná speciální příprava vzorku, zobrazení se provádí na vzduchu za přirozených podmínek. Použitím AFM je nyní možno například "vidět" různou tvrdost u složených materiálů a rozlišovat mezi tvrdými a měkkými oblastmi na povrchu vzorku (García and Pérez 2002, Otsuka et al. 2004).
- <u>Nanovroubkování, zatěžování a vyšetřování vzniklých vad (</u>zobrazování defektů jako jsou zlomy, dislokace) a pórů je další aplikace AFM, často po předchozím lokálním zatížení (teplotou, tlakem) zkoumaných vzorků.
- Mapování elasticity (Force Modulation Microscopy, FMM) je jedna z dalších aplikací AFM, ve které je možno sledovat mechanické vlastnosti vzorku. Používaná je zejména při zobrazování změny ve složení u směsných materiálů, analýze homogenity polymerů nebo například při detekci kontaminací ve výrobních procesech (Jalili and Layminarayna 2004).

### 2.9.2 Aplikace AFM v biologických oborech

Schopnost zobrazovat v kapalinách (zejména použití fyziologických pufrů) a shromažďovat dynamická data přineslo široké uplatnění AFM metody v biologii. Kromě zobrazování je metoda AFM používána také k manipulacím s membránami a molekulami, jsou měřeny různé lokální fyzikální a biofyzikální vlastnosti povrchů nebo monitorovány nejrůznější dynamické procesy ve vodním prostředí.

Vedle získání topografických snímků nejrůznějších vzorků patří bezesporu kvantifikace molekulárních interakcí v biologických systémech. Schopnost AFM měřit síly v nanonewtonovém rozsahu za fyziologických podmínek je využívána v mnoha biologických aplikacích, jako jsou například biomembránové vazebné interakce (Pereira 2001, Berquand et al. 2004<sup>20</sup>), protein/proteinové interakce (například Letho et al. 2003), cell/cell interakce nebo cell/protein interakce.

"Single molecule force spectroscopy", SMFS, je souhrnný název pro AFM metody, ve kterých jsou biopolymery napínány a nuceny ke konformačním přechodům nebo jsou zkoumány jejich materiálové vlastnosti (Hansma et al. 1997). SMFS experimenty jsou široce používány při zkoumání mechanických vlastností DNA (Williams et al. 2004), polysacharidů, proteinů a ostatních biopolymerů. Přehled aplikací SMFS můžeme najít například v Dufrene (2003).

Přestože je známo mnoho o struktuře a funkci jednotlivých složek buněčných membrán, mnoho těchto informací je dostupných pouze z nepřímých pozorování. Prostřednictvím NC-AFM je možno však měřit topografii, povrchové síly a mechanické vlastnosti membránových povrchů v nanometrovém rozlišení.

Hlavní nevýhodou, která omezuje využití AFM v biologii je laterální rozlišení. To závisí zejména na vlastnostech vzorku, konečném rozměru a tvaru hrotu a možnosti stlačení vzorku v důsledku aplikovaných sil (viz dříve). Dalším omezením v biologických AFM aplikacích je výběr vhodné metody, která dostatečně uchytí zkoumaný vzorek k substrátu.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Režimem C-AFM (NanoScope III (Digital Instruments, Santa Barbara, USA)) byla vizualizována interakce azithromycinu s lipidovou doménou (DPPC, SM, SM/Ch) v modelové biomembráně (DOPC).

Souhrnně lze říci, že za posledních patnáct let se využití AFM rozšířilo téměř do všech biologických odvětví, jmenujme například studie DNA (Hansma 2001), RNA (Lyubchenko et al. 1992a), proteinů (Czajkovsky and Shao 1998, Möller et al. 1999, Ikai 2002), lipidových membrán (Deleu et al. 2001, Kaasgaard et al. 2002, Lawrence et al. 2003), biomolekulárních komplexů, organel, mikrobiálních parazitů (Dvorak et al. 2000), virů (Kuznetsov et al. 2001, Kuznetsov et al. 2002), bakterií (Bolshakova et al. 2001<sup>21</sup>, Doktycz et al. 2003<sup>22</sup>) a buněk (Henderson1994, Nagao and Dvorak 1998, Lehenkari et al. 2000, Dvorak 2003, Méndez-Vilas et al. 2004, Moloney et al. 2004<sup>23</sup> Yu and Ivanisevic 2004).

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Zobrazována byla buněčná stěna *Escherichia coli* v různých podmínkách (po vysušení nebo *in situ*). Byly srovnávány snímky získané TP-AFM a C-AFM (NanoScope III, Digital Instrument, Santa Barbara, USA).

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> Na želatinou (gelatin) pokryté slídě byla imobilizována *Escherichia coli* a *Staphylococcus Aureus*. Zobrazování proběhlo na vzduchu i v kapalině použitím NC-AFM přístroje Pico SPM (Molecular Imaging Inc., AZ, USA). Pro modifikaci byla čerstvě odštípnutá slída ponechána 1-8 h v 0,01% vodném roztoku poly-L-lyzinu (o různé M<sub>r</sub>). Po skončení inkubace byla slída vyjmuta a ponechána přes noc uschnout. Želatinový roztok (Sigma, G6144) byl připraven rozpuštěním 0,5 g želatiny a 10 mg chromium amonium sulfate v 10 ml ultračisté deionizované vody při 60 °C. Po ochlazení na 40 °C byly do želatinového roztoku ponořeny slídové štěpy, které byly poté ihned vytáhnuty a ponechány uschnout přes noc.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Tento článek obsahuje přehledné reviw ohledně fixace buněk pro AFM pozorování, buňky byly zobrazeny na vzduchu použitím Explorer AFM (Veeco Instruments, Santa Barbara, USA) v režimu TP-AFM.

# 3 AFM nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou biomakromolekuly účastnící se přenosu genetické informace. Konkrétně deoxyribonukleová kyselina, DNA, nese ve své struktuře genetickou informaci všech živých organismů. Její konformační chování může ovlivnit důležité biologické procesy, jako je například exprese genu či interakce s proteiny. Proto je porozumění konformačním změnám nukleových kyselin jeden z velmi důležitých cílů molekulární biologie.

Chemicky jsou nukleové kyseliny biopolymery složené z nukleotidů. Nukleotidy se skládají z pentózy (deoxyribóza u DNA nebo D-ribóza u RNA), kyseliny fosforečné a organické báze (purinové - adenin, guanin, pyrimidinové - cytosin, thymin, uracil). Nukleodidy jsou navzájem spojeny 3',5'-fosfodiesterovou vazbou, která se tvoří mezi C3'deoxyribózy (ribózy) jednoho nukleotidu a C5'-deoxyribózy (ribózy) následujícího nukleotidu. Strukturně jsou rozlišovány lineární molekuly nukleových kyselin (ssDNA<sup>24</sup> nebo ssRNA, dsDNA nebo dsRNA, polynukleotidová vlákna mají volné 3'- a 5'-konce) a kruhové molekuly nukleových kyselin (ssDNA nebo ssRNA, dsDNA, bez volných konců).



Obr. 23: Nukleotid.

Makromolekuly izolovaných nukleových kyselin se svými vlastnostmi podstatně liší od ostatních biopolymerů, zejména od bílkovin. Základní odlišností je velká molekulová hmotnost DNA a relativní tuhost její lineární molekuly, podmíněná její dvojšroubovicovou konformací. Dehydratace těchto molekul jen jemně mění jejich nelokální uspořádání (změna formy B ve formu A). Toto je umožněno díky početným vodíkovým vazbám, jejichž zdroji jsou zejména nukleové báze, mezi nimiž se uplatňují

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Zkratka přejatá z anglické literatury vyskytující se běžně v českém odborném textu, ss – jednovláknová struktura (single stranded), ds – struktura ze dvou vláken (double stranded).

také hydrofobní interakce a  $\pi$  -  $\pi$  interakce. Fosfátové zbytky páteře polynukleotidových řetězců nesou záporné náboje, které umožňují poutat elektrostatickými silami kladně nabité ionty kovů (obvykle Mg<sup>2+</sup>) nebo protonované skupiny polyaminů a silně bazických bílkovin za vzniku nukleoproteinových komplexů.

Mezi charakteristické rysy konformace molekuly DNA řadíme zejména to, že vnější část dvojšroubovice je hydrofilní a nese záporné náboje. Molekula má na svém povrchu dva typy žlábků (rýhy) nestejné velikosti – velké a malé. Tyto umožňují interakce DNA například s bílkovinami, antibiotiky a podobně. Důležitou vlastností je schopnost dvojšroubovice rozplétat se a tak zpřístupnit v ní uloženou genetickou informaci. Molekula DNA je chemicky i strukturně jednou z nejvíce proměnlivých molekul, schopná přijmout celou řadu strukturních forem a reagovat různými cestami s jinými molekulami. Svou plasticitou se více blíží syntetickým polymerům než globulárním bílkovinám. Dynamická rovnováha různých konformací je ovlivňována pořadím nukleotidů, iontovou silou prostředí, přítomností bílkovin (například histonů) a rozsahem, v němž je molekula podrobena topologickému pnutí. Makroskopickým projevem různých konformací jsou rodiny A, B a Z konformací DNA.



Obr. 24: Konformační typy DNA.

Jediný typ uspořádané sekundární struktury, se kterým se u nukleových kyselin setkáváme, je dvojšroubovice (dihelix), viz obr. 24. Tato struktura vzniká tak, že dva polynukleotidové řetězce (nebo dva segmenty téhož řetězce) s opačnou polaritou a komplementární co do složení (obsahují proti sobě nukleotidy s doplňkovými bázemi) se vzájemně propletou kolem pomyslné společné osy. Oba polydeoxyribonukleotidové řetězce jsou přitom zformovány tak, že jejich páteře, sestávající se z pentózových kruhů a fosfátových zbytků jsou vně a báze je uvnitř dihelixu. Roviny bází jsou navzájem téměř rovnoběžné a kolmé na osu dvojšroubovice a skoro kolmé na roviny proložené cukernými kruhy. Klíčový význam při formování těchto struktur připadá vodíkovým vazbám vytvářeným mezi komplementárními bázemi. Pro stabilitu dihelikálních struktur se však považují za nejdůležitější  $\pi$  -  $\pi$  interakce (stacking interakce) mezi nukleovými bázemi. Tyto interakce vznikají překryvem  $\pi$  orbitalů aromatických kruhů bází (Vodrážka, Biochemie, (2000); Rozsypal, Úvod do molekulární biologie, (2000))



Obr. 25: Struktura dvojšroubovice DNA, bílou barvou atomy uhlíku C, červenou atomy kyslíku, oranžovou atomy fosforu a modrou barvou atomy dusíku.

Dihelikální struktury se často stáčejí do šroubovic vyšších řádů, tvořících terciární strukturu. S tímto jevem se setkáváme zejména u DNA, RNA nevytváří pravidelné symetrické struktury jako DNA, její struktury spíše formálně připomínají terciární struktury globulárních bílkovin.

Existují dvě topologicky odlišné formy nadšroubovicovitého vinutí: plektonemické a solenoidální. Plektonemické vinutí je typické pro molekuly volně rozpuštěné v roztocích, zatímco solenoidální vinutí je charakteristické pro DNA molekuly obtočené kolem histonů.

Nadšroubovicové vinutí, vznik uzlů (struktur vzniklých provlečením naštěpených konců jednořetězcové kružnicové DNA), katenanů (struktur vzniklých provlečením dvou nebo více dvouřetězcových kruhových molekul DNA) a spojování vláken jsou důležité jevy v buněčných procesech.





Obr. 26: *a) Plektonemické vinutí DNA. b) Solenoidní vinutí DNA.* 

## 3.1 <u>Příprava vzorků nukleových kyselin pro AFM</u> zobrazování

V roce 1990 bylo publikováno pouze okolo deseti článků věnovaných AFM biologickým studiím a všeobecně se předpokládalo, že moderní AFM technika bude zaměřena jen na analýzy anorganických povrchů. Jistým překvapením bylo, že po dvou letech se počet publikovaných článků ztrojnásobil a v roce 2001 již bylo publikováno více než 400 článků věnovaných čistě biologickým vzorkům. Z toho více než 70 bylo zaměřeno jen na studie DNA, RNA a komplexů nukleových kyselin s proteiny. Tento rozvoj byl umožněn především díky rychlému vývoji vhodných metod přípravy biologických vzorků.

Mezi průkopnické práce v AFM nukleových kyselin patří publikace Weisenhorna et al. (1990, 1991). V této době vědci teprve zkoušeli uchytit nukleové kyseliny k různě upraveným substrátům, například k navlhčenému krycímu sklíčku, čerstvě odštípnuté slídě nebo slídě upravené AlCl<sub>3</sub> (Weisenhorn 1990<sup>25</sup>), HOPG, či zlatu napařenému na slídě. DNA molekuly obvykle nebyly dostatečně pevně uchyceny ke svým substrátům a během skenování byly velmi často hrotem ze skenované oblasti odstraněny. Pokud byly získány AFM snímky nukleových kyselin (převážně plazmidů), obrysy nukleových kyselin byly velmi rozmazané.

V roce 1992 nastal skutečný rozvoj v AFM zobrazování nukleových kyselin, objevilo se mnoho publikací na toto téma. Byly vyzkoušeny různé metodické postupy k uchycení molekul DNA. Nejprve byly vzorky zobrazovány spíše ve vzduchu při různé relativní vlhkosti, postupně se přešlo na AFM zobrazování v organických rozpouštědlech a v pufrových roztocích. Zájem byl soustředěn na zvýšení adsorpce nukleových molekul k substrátu a na získání reprodukovatelných snímků.

Velkým přínosem pro AFM zobrazování bylo vyvinutí TP-AFM, který umožňuje zobrazovat i vzorky slabě uchycené k substrátu.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> Slída byla upevněna na držák AFM vzorků, opláchnuta 3 mM AlCl<sub>3</sub> a poté lehce vodou. Roztok ssDNA o koncentraci 0,13 μg/ml v 50 mM NaCl byl dán na slídu a zobrazován po jedné hodině inkubace ve vodě. Uchycení DNA bylo velmi slabé a publikovaný snímek vykazoval velmi nezřetelné vláknité struktury s výškou 0,6 nm.

V současné době jsou vyvíjeny metody specifické adheze DNA a hledají se podmínky uchycování, při kterých by křehká struktura komplexů DNA s proteiny nebyla poškozena během svého usazování na povrch substrátu.

V následujícím textu je prezentován rámcově chronologický přehled vývoje nejznámějších metodik a postupů k uchycení DNA na substrát.

### Vysušení roztoku DNA na vhodném substrátu

Nejjednodušším postupem při uchycení molekul DNA na vhodném povrchu je vysušení úměrného množství roztoku s DNA na substrátu, tzv. metoda "drop evaporation". V prvních studiích býval k vysušení roztoku DNA z povrchu substrátu běžně používán vzduch, později byl pro snížení kontaminace vzorku proud stačeného vzduchu nahrazen proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku či argonu.

Volba vhodného substrátu a roztoku, ve kterém je DNA rozpuštěna, hraje klíčovou roli pro získání kvalitního vzorku k AFM zobrazení. Pro usnadnění adsorpce je výhodné, aby substrát byl hydrofilní, a je nezbytné, aby měl dostatečně hladký povrch. Nejpoužívanějším substrátem v AFM aplikacích biologických makromolekul je bezesporu slída (muskovit).

Volba roztoku, ve kterém bude DNA rozpuštěna je obtížnější. Roztok musí být schopen udržet v určitém rozsahu pH pro zajištění chemické stability a biologické aktivity (funkčnosti) DNA, na druhou stranu chemikálie použité v pufrech znamenají vážný problém při dehydrataci, protože mohou krystalizovat, případně se vysrážet na povrchu substrátu během vysoušení vzorku (Zuccheri in press).

Určitým řešením v metodě "drop evaporation" může být rozpuštění DNA v ultračisté vodě<sup>26</sup>, kdy kapka tohoto roztoku DNA je vysušena po určité době inkubace<sup>27</sup> například na čerstvě odštípnuté slídě a vzorek DNA je zobrazován na vzduchu (Samori 1993). Jiným trikem je použití velmi nízkých koncentrací octanu

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> DNA rozpuštěná v destilované i deionizované vodě byla zobrazena metodou AFM i přesto, že někteří autoři udávají, že molekula DNA ztrácí v ultračisté vodě konformaci dvojité šroubovice (denaturuje). Dle mého názoru se však i v ultračisté vodě (v počátcích těchto výzkumů byla používána "jen" redestilovaná voda) dostatečné množství kationtů stabilizujících sekundární strukturu DNA.

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> Pod pojmem inkubace je myšleno ponechání roztoku DNA na povrchu substrátu po určitou konkrétní dobu. Není-li uvedeno v textu jinak, byl substrát vystaven působení roztoku DNA při pokojové teplotě, běžném tlaku a běžné relativní vlhkosti.

amonného (ammonium acetate) v roli pufru (Henderson 1992, Thundat et al. 1992). Tato sůl je schopná vypařit se společně s vodou a zanechat na povrchu substrátu pouze adsorbované DNA molekuly (Zuccheri in press). Později bylo ověřeno, že lze opatrně substrát s uchyceným vzorkem po inkubaci opláchnout proudem ultračisté vody (Fang and Hoh 1999<sup>28</sup>), případně jej několikrát krátce ponořit do vždy nových roztoků ultračisté vody.

Metoda "drop evaporation" je sice úspěšná pro uchycení DNA makromolekul, ale neumožňuje kontrolu iontové síly roztoku během jeho vypařování (Zuccheri in press).

### Slída aktivovaná multivalentními kationty

V roce 1992 Bustamante<sup>29</sup> se svými kolegy ukázal, že za použití uhlíkem upraveného hrotu je možno metodou AFM zobrazit kruhový plazmid dsDNA. Tento snímek byl získán s rozlišením 8 - 10 nm a zobrazení proběhlo ve vzduchu. Metoda uchycení dsDNA byla založena na poznatku, že kostra DNA nese za neutrálního pH záporný náboj. Multivalentní kationy, jako je například Mg<sup>2+</sup>, adsorbované na povrchu slídy jsou schopny vytvořit můstky mezi slídou a DNA. Tím uchytí DNA molekulu prostřednictvím elektrostatických interakcí k povrchu slídy. Jak již bylo zmíněno dříve, povrch slídy má ve vodním prostředí záporný náboj, neboť draselné kationty (případně i další kationty, konkrétně dle druhu slídy) z povrchu disociují. Pozdější experimenty ukázaly, že předchozí upravení slídy kationty není nezbytné. Uchycení DNA přes slabé elektrostatické síly se uskuteční i tehdy, budou-li příslušné kladné ionty přítomny v pufru společně s adsorbující se nukleovou kyselinou (Bezanilla 1995, Rivetti and Codeluppi 2001<sup>30</sup>, Sanchez-Sevilla et al. 2001<sup>31</sup>, Nagami et al. 2002<sup>32</sup>, Pastré et al. 2003).

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Po třech minutách inkubace DNA roztoku na silanizovaném substrátu byl povrch substrátu kontinuálně oplachován 10 s deionizovanou vodou a následně osušen stlačeným vzduchem.

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Adheze DNA na slídu upravenou kationty byla dostatečně silná pro skenování v kontaktním režimu. Použité skenovací síly měly hodnotu 20 nN, při skenování však byla DNA často lokálně poškozena hrotem. Laterální rozlišení získaných snímků bylo kolem 2 nm, zatímco výška zobrazené DNA, měřená z AFM snímků byla méně než 2 nm. Tato hodnota byla dána konečným rozměrem použitého hrotu a stlačením DNA skenujícími sílami.

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> DNA fragmenty (564, 1054 a 4297 bp) byly na čerstvě odštípnuté slídě inkubovány v 4 mM HEPES, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 1–5 minut. Poté byl povrch slídy opláchnut několika mililitry deionizované vody a povrch byl osušen plynným dusíkem. Snímky byly získány NanoScope III (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) v TP-AFM.

Vedle Mg<sup>2+</sup> byly k aktivaci slídy úspěšně použity také jiné divalentní, obecně multivalentní kationty, například Co<sup>2+</sup>, La<sup>2+</sup>, Zr<sup>4+</sup> (Thundat et al. 1992). Díky různým variacím v této metodě<sup>33</sup> založené na principu adsorpce DNA na substrát za asistence kationtů byly nespočetněkrát zobrazeny molekuly dsDNA, pohybující se dsDNA a DNA – proteinové komplexy.

Pro zvýšení hydrofilních vlastností povrchu se substituovanými ionty bylo doporučováno vystavit kationty modifikovaný povrch slídy doutnavému výboji (glow discharge). Tato úprava však není pro zobrazení DNA nezbytná (Hansma et al. 1992).

Adsorpce DNA na slídu upravenou kationty obecně požaduje relativně velké koncentrace DNA, v rozsahu 10 až 100 µg plazmidu/ml roztoku (pro plazmidy o délce řádově několika kbp).

### Modifikovaná Kleinschmidtova metoda

Modifikovaná Kleinschmidtova metoda byla jedním z dalších experimentálních přístupů použitých v počátcích rozvoje metodik pro AFM. Tuto metodu publikoval v roce 1968 Kleinschmidt (1968) a v současnosti je stále při přípravě AFM vzorků používána. Metoda spočívá v rozptýlení DNA s vhodnými proteiny na povrchu vodní fáze, kdy takto vzniklý film je přenesen na substrát. Touto metodou Yang et al. (1993) zobrazili dehydratovanou molekulu plazmidové DNA. Pro usnadnění adsorpce byl povrch čerstvé slídy nejprve pokryt uhlíkem<sup>34</sup>. Takovýto povrch vykazuje velkou

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Roztok 1 nM DNA (inzert AsMPL) v 10 mM TRIS-HCl, 1mM NiCl<sub>2</sub> byl ponechán na čerstvě odštípnuté slídě inkubovat dvě minuty. Poté byl roztok DNA na slídě opláchnut 40 ml deionizované vody (Millipore) a povrch byl osušen filtračním papírem. Pro zobrazování v kapalině byl roztok DNA opláchnut 200 µl pufrového roztoku. K zobrazování byl použit NanoScope III (Digital Instrument, Santa Barbara, USA) v režimu TP-AFM.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> AFM snímky plazmidové DNA pBR322 byly pozorovány na vzduchu po inkubaci v pufrových roztocích o různé iontové síle (10 mM TRIS-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 nebo 10 mM TRIS-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>,50 mM NaCl, pH 7,4). Roztok DNA byl ponechán inkubovat na čisté slídě 2 minuty, poté byl povrch slídy opláchnut MilliQ vodou a osušen plynným dusíkem (protokol 1) nebo byl opláchnut malým množstvím 0,2% vodného roztoku uranyl acetate a ihned osušen plynným dusíkem (protokol 2).

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> Čerstvě odštípnutá slída byla nechána krátce v ultrazvuku v deionizované vodě a poté na dobu 4–24 hodin v roztoku 33 mM octanu hořečnatého. Takto ošetřená slída byla opět opláchnuta deionizovanou vodou nebo pufrem a dána do ultrazvuku (15–30 minut). Následovalo osušení upravené slídy (stlačený vzduch, dusík, argon) a její použití k nanesení roztoku s nukleovou kyselinou(obvykle BlueScript, Stratagene) který byl po inkubaci (10–30 min) vysušen. Metodika postupu převzata například z: Li et al. (1992), Vesenka et al. (1992); Bustamante et al. (1992); Hansma et. al. (1992).

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> Čerstvě odštípnutá slída byla pokryta uhlíkem v napařovači (evaporator) po dobu 30–40 minut, za použití proudů kolem - 45A, aby vytvořený uhlíkový film byl co nejméně zrnitý. Uhlíkem pokrytá slída byla ponechána přes noc v pícce při 200 °C.

hydrofobicitu. K roztoku DNA<sup>35</sup> byl přidán cytochrom  $c^{36}$  (Po ponechání malé kapky DNA roztoku na očištěné skleněné tyčince se na rozhraní voda – vzduch spontánně vytvořil protein-DNA film. Tento proteinový film s uchycenou DNA byl přenesen na hydrofobní uhlíkový povrch, kde byl po vysušení velmi pěkně usazen. Laterální rozlišení AFM snímků DNA bylo v rozmezí 6 – 10 nm, autoři předpokládají, že naměřená výška DNA byla menší z důvodu stlačení zobrazované molekuly během skenování hrotem (tedy redukovaná výška DNA). Yang ve své práci prezentoval již stabilní a reprodukovatelné snímky DNA – proteinového komplexu zobrazeného na vzduchu za použití komerčně dostupných hrotů (Yang et al. 1993a).

Místo cytochromu c byly použity k uchycení molekul DNA také kationtové detergenty, například benzyl-dimethyl-alkylamonium chlorid (BAC). Tento detergent, použitý v mikromolární koncentraci<sup>37</sup> umožnil zobrazit na vzduchu a v n-propanolu plazmidy s nadšroubovicovou strukturou i relaxované a linearizované plazmidy DNA<sup>38</sup> (Schaper et al. 1993a).

O rok později Schaper<sup>39</sup> ve své další práci prezentoval odlišný přístup, kdy reprodukovatelné snímky DNA ve vzduchu a v n-propanolu získal za použití neiontových a kationtových detergentů rozptýlených v roztoku s DNA. Použitý nonionický detergent byl 2,4,6-tris(dimethylaminomethyl) phenol (DMP-30), kationtový

 $<sup>^{35}</sup>$  Ds DNA (10 kpb, koncentrace 2 µg/ml) byla rozpuštěna v 50 % v/v vodném roztoku formamidu, cytochromu c (100 µg/ml), 10 mM TRIS, 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH 8. NH<sub>4</sub>-acetate byl také použit místo formamidu, v tomto případě však byly získány snímky s poměrně horším rozlišením.

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> Pojem cytochrom c zahrnuje skupinu proteinů. Použitý typ měl 12kDa, v roztocích tento protein nese kladný povrchový náboj.

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> 0,5 µl roztoku BAC o  $10^{-3}$  % koncentraci bylo přidáno k 10 µl kapce roztoku DNA na parafilmu (konečná koncentrace BAC v roztoku DNA byla 5. $10^{-5}$  %). Kapka byla ponechána v klidu deset minut, poté byla shora přiklopena čerstvě odštípnutou slídou a ponechána jednu minutu inkubovat. Slída byla v některých případech před přiklopením vystavena doutnavému výboji (glow discharge) pro zvýšení adsorpce. Po inkubaci byl roztok DNA ze slídy odstraněn osušením v rozích filtračním papírem a povrch slídy byl dále vysušen proudem vzduchu.

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> Relaxované formy plazmidu bylo docíleno přidáním topoizomerázy I do roztoku s DNA a linearizace přidáním restrikční endonukleázy.

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> Čerstvá slída byla předupravena doutnavým výbojem po dobu jedné minuty. Poté byla ponořena do čerstvě připraveného roztoku detergentů (vodný roztok DMP-30 nebo vodný roztok CP), o koncentraci 10 µg/ml. Do 0,5 µl roztoku detergentu byl přidán roztok DNA (koncentrace 1 µg/ml, množství neuvedeno). Takto vzniklá směs byla ponechána pět minut inkubovat na parafilmu. Teprve poté byla na roztok DNA s detergenem ze shora přiložena slída, která byla ponechána v kontaktu s roztokem jednu minutu. Po inkubaci byl přebytek kapaliny ze slídy odsát filtračním papírem, slída byla lehce opláchnuta deionizovanou vodou a uložena do Petriho misky k usušení na vzduchu. Pro měření v propanolu byla slída s DNA také nejprve vysušena a poté ponořena do rozpouštědla (Schaper et al.1994).

detergent cetylpyridinium chloride (CP). Alternativou bylo rozptýlení detergentu na povrch substrátu ještě před nanesením roztoku s DNA (Schaper et al. 1994).

Úprava slídy kationty stejně jako uchycení DNA Yangovou metodou se ukázalo jako dostačující pro reprodukovatelné zobrazování DNA i DNA komplexů s proteiny, i když rozlišení struktury DNA nebylo dostatečné pro rozpoznání jemné struktury DNA. Nízké rozlišení bylo s největší pravděpodobností způsobeno částečně díky denaturačním procesům a částečně vlivem adhezních sil mezi hrotem a skenovaným povrchem. Byly-li vzorky upravené zmíněnými metodami zobrazovány v alkoholu, reprodukovatelnost snímků i celkově stabilita DNA během skenování se znatelně zvýšila, což bylo způsobeno zejména redukcí adhezních sil působících mezi hrotem a zobrazovaným povrchem. K zobrazování byl použit ethanol, izopropanol nebo n-butanol (Hansma et al. 1992<sup>40</sup>, Schaper et al. 1993a, Schaper et al. 1994).

Ze všech dosud uvedených metod je úprava slídy prostřednictvím kationtů díky své jednoduchosti často používaná, například v Hansma et al. 1996, Bezanilla et al. 1995, Nagami et al. 2002 nebo Pastré et al. 2003. Omezením této metody je však striktní požadavek na přítomnost mulitvalentních kationtů v roztoku s DNA. Určitá minimální koncentrace kationtů v pufru s DNA je tedy nezbytným faktorem při AFM zobrazování nukleových kyselin prostřednictvím kationtů.

## Použití LB vrstev při zobrazování nukleových kyselin

Z hlediska vhodnosti pro AFM zobrazování nukleových kyselin byly zkoumány také LB vrstvy tvořené nasycenými mastnými kyselinami nebo lipidy. Tyto LB vrstvy (převážně monovrstvy) mohou nést při volbě vhodných amfifilních molekul nebo po úpravě divalentními kationty kladný povrchový náboj (Schaper 1993b). Díky tomuto kladnému náboji je možno LB vrstvy využít jako substrát adsorpci nukleových kyselin. Například LB lipidová monovrstva, tvořená směsí 1:1 DODAB / DPPG a LB

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> Roztok dsDNA (BlueScript II, Sttatagene, California a pSK 31 gift from Rees, University of Oregon) byl inkubován na povrchu slídy inkubované před nanesením roztoku DNA po 4-24 hodin v octanu hořečnatém. Vzorky byly zobrazovány v butanolu a propanolu po předchozím vysušení stlačeným vzduchem.

monovrstva tvořená kyselinou arachidovou<sup>41</sup> byly vhodným substrátem k uchycení DNA (Weisenhorn et al. 1991). Oba typy LB vrstev byly naneseny na čerstvě štěpenou slídu a na slídu modifikovanou silanizací OTS. Lipidové vrstvy samotné i lipidové vrstvy s adsorbovanou DNA<sup>42</sup> byly zobrazovány ve vodném prostředím (voda nebo pufr), avšak získané snímky nebyly stabilní a zobrazování bylo velmi obtížné (Weisenhorn et al. 1991).

Lipidovou dvojvrstvu použili k adsorpci DNA také Mou et al. (1995). Pro vytvoření lipidové dvojvrstvy vybrali takové lipidy, které mají při neutrálním či nízkém pH kladný povrchový náboj (1,2-dipalmitoyl-3-trimethyl-ammonium-propan, DPTAP). Lipidová dvojvrstva byla vytvořena dvěma různými metodami: fůzí váčků<sup>43</sup> a použitím Langmuir-Blodgettovy metody<sup>44</sup> skrz dva přechody rozhraním. Lipidové dvojvrstvy připravené druhou metodou vykazovaly mnohem lepší kvalitu.

Zobrazování DNA<sup>45</sup> v pufru o nízké iontové síle bylo problematické, adsorpce DNA byla nízká a zobrazená DNA měla vždy nadšroubovicovou strukturu. Po přidání 1 mM EDTA.Na<sup>46</sup> do pufru adsorpce DNA prudce vzrostla. Zobrazované plazmidy vykazovaly ve zvýšené míře relaxovanou konformaci, často se dokonce překrývaly (díky vysoké koncentraci DNA v pufru), což činilo problémy při vyhodnocování délky jednotlivých plazmidů. Při zvyšování iontové síly použitého pufru (až na 500 mM NaCl) se úměrně snižovala schopnost uchycení (adsorpce) DNA na dvojvrstvě. Toto zjištění odpovídá předpokladům, že mezi DNA a "kationtovou dvojvrstvou" je

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> Kyselina arachidová se svým dlouhým saturovaným řetězcem patří mezi karboxylové kyseliny. Divalentní kationty (Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>) jsou při tvorbě LB membrán přidávány do roztoku vodní fáze ve formě solí v submilimolární koncentraci. Tyto kationty zvyšují stabilitu LB filmu a zároveň usnadňují uchycení LB vrstvy k substrátu i vlastní adsorpci DNA vzorku na LB vrstvu. Při nízkém pH amfifilní molekula kyseliny arachidové není disociována, kationty neovlivní monovrstvu na vodní hladině a nejsou začleněny do uchycovaného LB filmu. Při vysokém pH amfifilní molekuly disociují a asociují rozpuštěné kationty (Kurnaz 1996).

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> DNA (16 bp ssDNA, obsahující pouze cytosin a thymin) byla rozpuštěna v 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,002 % NaN<sub>3</sub>, pH 7,45, koncentrace ssDNA byla 20 μg/ml.

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> Fůze váčků (vesicles): malé lipidové váčky byly připraveny opakovaným ultrazvukováním lipidové suspenze. Koncentrace lipidů v suspenzi byla 0,25 mg/ml, použitý roztok byl 20 mM NaCl nebo 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr pH 6,0 s 20 mM NaCl. Malá kapka lipidové suspenze s váčky (20 μl) byla ponechána na čerstvě odštípnuté slídě přes noc, poté byla slída nechána dvě a půl hodiny při 70 °C.
<sup>44</sup> LB metoda: lipidy byly rozpuštěny ve směsi hexan/ethanol v/v 9:1. Koncentrace lipidů v rozpouštědle

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> LB metoda: lipidy byly rozpuštěny ve směsi hexan/ethanol v/v 9:1. Koncentrace lipidů v rozpouštědle byla 1 mg/ml.

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> Použitá plazmidová DNA (*Escherichia coli*, 4,36 kbp (pBR 322) a 6 kbp fragmenty Hae III, Sigma) o koncentraci 20 μg/ml (20 mM NaCl nebo 10 mM TRIS, 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH 8) v množství 10μl byla přidána přímo do roztoku překrývajícího kationtovou dvojvrstvu. Konečná koncentrace DNA byla okolo 1 nM. Doba inkubace DNA se lišila od hodiny po několik hodin. Poté byly vzorky jemně opláchnuty a ihned zobrazovány ve stejném pufru.

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> EDTA.Na<sub>2</sub> chelatuje zbytkové divalentní kationty, jako je Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>. Tyto jsou vždy přítomny v mikromolárních koncentracích, a to i když používáme 10 MΩ.cm čistou vodu. Adsorpce DNA k substrátu vzrostla, bylo-li v purfu přidáno1mM EDTA.Na<sub>2</sub>.

elektrostatická interakce. Byla-li lipidová dvojvrstva s adsorbovaným plazmidem inkubována při 50 – 55 °C v přítomnosti EDTA.Na<sub>2</sub> po dobu jedné hodiny, DNA se hustě a jednotně svinula (respektive vytvořila kompaktní obrazec ve stylu bludiště). Šířka molekuly DNA měřená z AFM snímků byla vždy pod 3 nm (plná šířka měřená v poloviční výšce).

Vlákna DNA vykazovala na svém povrchu dobře rozlišené zářezy, vyskytující se s periodou 3,4 nm  $\pm$  0,4 nm, což je ve shodě se známou hodnotou roztečí širokých, hlubokých žlábků ve struktuře dvojité šroubovice (typ B). Toto ukazuje, že struktura adsorbované dsDNA na lipidové dvojvrstvě není výrazně ovlivněna elektrostatickou interakcí s lipidy.

Uvedenou metodou byly získány snímky s dosud nejdetailnějším rozlišením struktury DNA<sup>47</sup> a tyto úspěchy v zobrazování topografie DNA molekul vedly ke spekulacím, zda by šlo využít metodu AFM k sekvenování. K odlišení jednotlivých bází je však zapotřebí získat snímky DNA s rozlišením lepším než 0,5 nm (Mou et al. 1995).



Obr. 27: AFM snímek hustě uspořádaných molekul DNA (převzato z Mou et al. 1995).

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> Zobrazování proběhlo v C-AFM, použitý typ AFM byl NanoScope II, Digital Instrument. Skenování při pokojové teplotě, frekvence skenování 5–12 Hz, použity byly nosníky s "oxide sharpened tips" o konstantě tuhosti 0,06 N/m. Skenovací síly byly v rozsahu 0,1–0,2 nN.

### Metody silanizace slídy

Yuri Lyubchenko a spolupracovníci (Lyubchenko et al. 1992a) dosáhli velmi silné adheze DNA k povrchu slídy upravené APTESem. K zobrazení dlouhé dsDNA, ssDNA a ssRNA<sup>48</sup> byla chemicky modifikována "ruby mica" dvěma odlišnými procedurami, "liquid APTES<sup>49</sup>" a "vapour APTES<sup>50</sup>", kdy aminoskupiny silanizovaného povrchu byly v některých případech methylovány. Methylace aminových skupin dává povrchu ponořeném v roztoku pozitivní náboj nezávisle na pH vodného roztoku.

DNA<sup>51</sup> i RNA byly rozpuštěny v pufru, osahujícím 10 mM TRIS-HCl, 10 - 20 mM NaCl, 5 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH 7,4. Modifikovaná AP-slída byla ponořena do pufru obsahujícím příslušný typ nukleové kyseliny při pokojové teplotě na dobu jedné až dvou hodin. Poté byla slída s adsorbovanými molekulami opláchnuta deionizovanou vodou, osušena v rozích filtračním papírem a osušena ve vakuu.

Kvalitní AFM snímky byly získány jak pro methylovaný povrch (krok 1 i krok 2), tak pro aminopropylový povrch (krok 2 byl vynechán). Při velké koncentraci APTESu (0,1 M) byl silanizovaný povrch nerovný, při mnohem nižších koncentracích APTESu v rozpouštědle (0,1  $\mu$ M) byly tyto nerovnosti redukovány. Touto metodou byla zobrazena DNA a RNA ve vzduchu a poté byla tatáž biomolekula zobrazena v kapalině (Lyubchenko et al. 1992b, 1992a).

Jak bylo zmíněno dříve, existuje mnoho různých variant procesu silanizace substrátu. Níže uvedené metody byly použity k uchycení nukleových kyselin. Pro silanizaci lze vystavit povrch substrátu APTESovým parám, ponořit povrch substrátu do

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> Například fragmenty plazmidu pBR 322 DNA.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> V této metodě šlo konkrétně o inkubaci čerstvé slídy v čerstvě připraveném roztoku 3aminopropyltriethoxysilanu (0,1  $\mu$ M – 0,1 M) v toluenu nebo dimethylformamidu po dobu několika hodin s mírným protřepáváním, následuje opláchnutí čistým rozpouštědlem a sušení (krok 1). Osušené štěpy slídy byly ihned ponořeny do methyliodidu (methylové skupiny jsou substituovány za aminové) a byly zde ponechány jednu hodinu. Následovalo opět sušení (krok 2).

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> Množství APTESu v exsikátoru bylo 30 μl. Po silanizaci opět následuje methylační procedura jako v předchozím případě.

 $<sup>^{51}</sup>$  Koncentrace DNA byla v rozmezí 0,1–0,01 µg/ml, v závislosti na délce zobrazované nukleové kyseliny.

vodného (Feng et al. 2000, Nagami et al. 2002<sup>52</sup>,), acetonového (Karrasch<sup>53</sup> et al. 1993, Saal et al. 2002<sup>54</sup>), dimethylformamidového (Lyubchenko et al. 1992b) nebo toluenového roztoku APTESu (Lyubchenko 1992b), někteří autoři preferují použití částečně hydrolyzovaného roztoku silanu (Fang and Hoh 1999).

Při srovnání obou metod silanizace, tj. "vapour<sup>55</sup>" a "liquid" You and Lowe (1996) došli k závěru, že "vapour" silanizace poskytuje hladší a stabilnější<sup>56</sup> silanový film na povrchu substrátu než metoda "liquid" silanizace (You and Lowe 1996). Tito autoři také doporučují ponořit silanizované povrchy do roztoku SDS, který dle nich stabilizuje silanovou vrstvu.

Vhodnost AP-slídy (AP-mica) k uchycení DNA molekul již byla mnohokrát prokázána. Z novějších článků uveď me například Feng et al. (2000), Lyubchenko and Shlyakhtenko (1997), Shlyakhtenko et al. (2000).

AP-slída může uchytit DNA za různých podmínek: při inkubaci od 0–60 °C, za použití různé iontové síly pufrových roztoků, při různých koncentracích DNA - až pro 0,01  $\mu$ g/ml pro  $\lambda$ DNA (Zuccheri in press).

V principu je možné modulovat sílu adsorpce DNA k povrchu snížením hustoty aminopropylových skupin na slídě. Experimenty publikované v literatuře ukazují, že DNA je k silanizovanému povrchu přichycena velmi silně, až příliš. Jak bylo zmíněno výše, v současnosti je zájem při přípravě substrátu zaměřen na kontrolu a modulaci adheze nukleových kyselin k substrátu.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> AFM snímky plazmidové DNA (pBR 322) byly pozorovány v kapalině. Na čerstvě odštípnutý slídový substrát bylo naneseno 10 μl 0,0002% vodného roztoku APTESu (Shinetsu chemicals, Japan) a bylo zde ponecháno dvě minuty. Poté byla slída opláchnuta 10 ml čisté vody, osušena proudem plynného dusíku a ponechána 70 min při 110 °C. Na silanizovaný substrát bylo naneseno 10 μl DNA roztoku (10 mM TRIS-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, pH 7,4) a byl ponechán inkubovat dvě minuty. Poté byla naplněna stejným pufrem a povrch sídy byl zobrazován v pufrových roztocích o různé iontové síle. Snímky byly pořízeny NanoScopeII, Digital Instruments, Santa Barbara CA, použitím komerčních Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hrotů v režimuTP-AFM.

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> V této práci bylo APTESem silanizováno krycí sklíčko a to v 2% roztoku APTESu v 95% v/v vodném acetonu.

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> V této práci autoři upozorňují, že formování, struktura a tloušťka silanové vrstvy vytvářené metodou "liquid APTES" je extrémně citlivé na množství vody přítomné v rozpouštědle. Voda v rozpouštědle a na povrchu substrátu vytváří během silanizace samovolně zpolymerizované silanové trojrozměrné klastry nanometrových rozměrů. Taktéž metoda "vapour APTES" je během vytváření silanového filmu na povrchu substrátu extrémně citlivá na vlhkost a koncentraci silanových par. Přesto jsou v této metodě paramenty silanizace lépe kontrolovány než v metodě "liquid APTES".

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> Metoda "vapour" silanizace bývá v literatuře uváděna také pod pojmem CVD, chemical vapour deposition.

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> Povrchy byly charakterizovány v pojmech povrchové topografie, povrchové nerovnosti, tloušťkou silanizované vrstvy a velikosti adheze vrstvy k substrátu.

AP-slída je velmi úspěšná také při zobrazení DNA ve vodných roztocích, kdy adheze DNA k silanizovanému substrátu je stále dostatečně silná. Navíc se zdá, že adheze DNA k silanizovanému povrchu je tak rychlá, že molekuly DNA jsou "zmrazeny" v takové konformaci, kterou pravděpodobně mají v roztocích. Tvar molekuly zachycený AFM skenováním tedy reprezentuje projekci tvaru, který mají molekuly v roztoku (Zuccheri in press). Pohyblivost uchycených DNA molekul na silanizovaném povrchu je velmi omezená, jak ukazují opakované skeny téhož místa substrátu v čase (tzv. "time-lapse" experimenty) a příliš silná adsorpce DNA k silanizovanému substrátu může být limitujícím faktorem při dynamických studiích adsorbovaných molekul (Rivetti et al. 1996, Lyubchenko et al. 1997).

Je nutné neopomenout, že povrchové úpravy substrátu často dávají vzniknout znečištěnému povrchu a že není možné udržet všechny experimentální parametry pod přísnou kontrolou (například okolní vlhkost, doba reakce, čistota použitého silanu, koncentrace silanu, kvalita slídového povrchu). Úprava povrchu APTESem ("vapour" i "liquid") není výjimkou a nečistoty v použitých reaktantech nebo částečná polymerace a nehomogenity dávají při silanizaci vzniknout heterogennímu povrchu (kde pouze malé oblasti jsou dostatečně rovné a vhodné pro AFM analýzy). Kvalita silanizovaného povrchu se tedy může lišit vzorek od vzorku (You and Lowe 1996b, Tanigawa 1998, Fang and Hoh 1998).

Silanizované povrchy by měly být jemně opláchnuty, aby byly odstraněny neuchycené silanové molekuly. Ty mohou způsobit jistou formu kondenzace (shluky) zobrazované DNA. Ošetření silanizovaného povrchu vyššími teplotami (kolem 100 °C) nebo vakuem redukuje přítomnost mobilních silanových molekul a proto snižuje pravděpodobnost kondenzace DNA na upravený silanový povrch. Tyto úpravy silanizovaného povrchu před nanesením vzorku jsou vhodné zejména pokud připravujeme povrch pro DNA adsorpci (Fang and Hoh 1998).

Pravděpodobně nejpoužívanějším silanem je dosud APTES. Mírně modifikované metody silanizace slídy uvedené v Lyubchenko et al. 1992 jsou použity

také například v pracích: Bezanilla et al. (1995), Tanigawa (1998), Fang and Hoh<sup>57</sup> (1998), Shlyakhtenko et al. (1998, 1999), Umemura et al. (2000), Kim et al. (2002<sup>58</sup>), Sasou et al. (2003), Shlyakhtenko et al. (2003b).

Z hlediska výběru správných pufrů, ve kterých je pro AFM zobrazování DNA rozpuštěna, je velmi zajímavý článek Bezanilla et al. (1995). Autoři zde zobrazují DNA adsorbovanou z různých roztoků o stejném pH na silanizovanou slídu<sup>59</sup> a čistou slídu a vyhodnocují množství uchycených plazmidů<sup>60</sup> DNA v jednotlivých případech. Ze závěrů publikovaných v článku vyplývá, že množství adsorbované DNA závisí výrazně na složení pufrového roztoku. DNA rozpuštěná v HEPES-Mg pufru se adsorbuje vcelku dobře, hůře adsorpce probíhá pokud je DNA rozpuštěna v TRIS-Mg pufru a nejméně pro TRIS-Mg-K pufr. Pro TRIS-EDTA.Na2 nebo HEPES-KCl (nepublikovaná data) se DNA na slídu neadsorbuje. Při vysokých koncentracích DNA ve vodě se na povrchu slídy během adsorpce vytváří agregáty DNA (shluky několika plazmidů). Proto je vhodné inkubující se roztok s DNA osušit ihned po nanesení roztoku na slídu. Agregace DNA se objevuje pouze u DNA rozpuštěné v ultračisté vodě, při adsorpci DNA z pufrových roztoků je DNA dobře rozptýlena na povrchu slídy. DNA adsorbuje mnohem lépe na AP-slídu než na čistou slídu v každém ze zkoumaných roztoků, kromě HEPES-Mg. Na druhou stranu kvalita AP-slídy se může mnohem více lišit u jednotlivých připravených povrchů, než je tomu u čisté slídy. Závěry publikované v této práci jsou shrnuty v tabulce 2.

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> Pro silanizaci byl připraven 1% roztok vhodného silanu (3-aminopropyl-triethoxysilane, APTES, 3-aminopropyl-trimethoxysilane, AEA, 3-(2-(2-aminoethyl)-ethylamino)-propyl-trimethoxysilane, AEEA) ve vodném roztoku 1 mM kyseliny octové (pH 3,5), roztok byl ponechán pět minut částečně hydrolyzovat. Substrát (křemíková destička) byl poté vertikálně ponořen do roztoku silanu a ponechán zde po dobu desíti minut. Poté byl silanizovaný substrát z roztoku vyjmut a oplachován proudem deionizované vody po dobu 10 –20 s pro odstranění neuchycených molekul silanu a osušen stlačeným vzduchem. Čerstvě silanizované substráty byly ponechány následně v sušičce při 100 °C po dobu dvou hodin. Takto připravené substráty byly ihned použity k uchycení molekul DNA, které byly zobrazovány v organických rozpouštědlech. Na AFM snímcích byly pozorovány podobné morfologické změny jako v Mou et al. (1995). Zhušťování DNA bylo v tomto případě provázeno vznikem agretátů různé morfologie, včetně prstencovité.

<sup>&</sup>lt;sup>58</sup> Použitým reagentem byl octadecyltriethoxysilan OTE, substrátem slída, metoda silanizace byla založena na "liquid APTES" silanizaci v inertní atmosféře.

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup>Slída byla silanizována metodou "vapour APTES".

 $<sup>^{60}</sup>$  Při adsorpci DNA na čerstvou čistou slídu byla na slídu nanesena DNA v daném roztoku, množství 1 μl. V případě vody byl povrch ihned po nanesení osušen stlačeným vzduchem, u ostatních pufrů byl roztok ponechán na povrchu slídy 30 s až minutu, opláchnut dvěma mililitry deionizované vody a poté osušen proudem stlačeného vzduchu. Na silanizovaný povrch byl nanesen roztok DNA (50 μl), po inkubaci byl vzorek opláchnut deionizovanou vodou a osušen. DNA rozpuštěná jen ve vodě nebyla před vysušením oplachována. Před zobrazováním byly všechny vzorky drženy v exsikátoru plněném P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Tab. 2: Adsorpce plazmidové DNA na slídu a silanizovanou slídu. Číselné hodnoty udávají plazmid/µm<sup>2</sup>, hodnoty byly vypočítány z devíti nezávislých vzorků, koncentrace DNA byla 1 ng/ml (Bezanilla et al. 1995).

	/	
roztok, ve kterém byla		
plazmidová DNA inkubována	neošetřená slída	AP -slída
na substrátu		
voda	0,4±0,1	6,4±3,0
HEPES - Mg <sup>61</sup>	3,2±2,2	3,9±2,8
TRIS - Mg <sup>62</sup>	1,9±0,8	nebylo měřeno
TRIS - Mg - K <sup>63</sup>	0,4±0,2	5,6±2,5
TRIS - EDTA.Na <sup>64</sup>	0	4,4±2,4

Jinou variantu silanizace publikoval v roce 2000 Tang<sup>65</sup> et al. (2000). Autoři uvádí, že řetězce silanových molekul jsou navzájem pospojovány a vytváří tak síť s nanometrovými póry, kdy právě pórovitá strukutura silanového filmu je velmi výhodná, neboť umožňuje redukci akumulace<sup>66</sup> solí obsažených v pufrech. Pórovitá struktura silanizovaného filmu je zřetelná pouze v oblastech s vysokým rozlišením. RMS silanizovaného povrchu má hodnotu 0,16 nm.

Ze struktury adsorbovaných DNA molekul a z analýzy adhezních sil autoři v závěru článku usuzují, že existence hydratovaných vrstev solí na povrchu vzorku je nejdůležitější faktor snižující rozlišení DNA snímků (Tang et al. 2000).



Obr. 28: Schéma vrstev hydratovaných solí na povrchu substrátu neošetřeného silanizací.

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> 40 mM HEPES-KOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6.

<sup>&</sup>lt;sup>62</sup> 40 mM TRIS-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6.

<sup>&</sup>lt;sup>63</sup> 40 mM TRIS-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 7,6.

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH 7,6.

<sup>&</sup>lt;sup>65</sup>Čerstvé štěpy slídy byly ponechány v APTES parách získaných odpařováním APTESu (300  $\mu$ l) po dobu čtyřiceti minut až dvou hodin. Silanizovaná slída byla poté ponechána v exsikátoru na osm hodin, následovalo zahřátí na 105 °C a silanizovaná slída byla ponechána při této teplotě po dobu tří hodin. DNA byla rozpuštěna ve vodě na koncentraci 1 ng/ $\mu$ l, případně v TRIS-HCl pufru a kapka roztoku DNA byla dána na silanizovanou slídu. Roztok DNA byl inkubován jednu až dvě minuty při pokojové teplotě a poté byl vysušen z povrchu slídy proudem plynného dusíku. AFM snímky byly získány typem NanoScope III (Digital Instrument, Santa Barbara, USA), k zobrazování byly použity Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hroty a TP-AFM režim.

<sup>&</sup>lt;sup>66</sup>Akumulace solí je nevyhnutelná během vysoušení DNA pufrového roztoku na povrchu slídy.



Obr. 29: Schéma vrstev hydratovaných solí na povrchu silanizovaného substrátu.

Metody silanizace substrátu se mohou lišit také v době, po kterou probíhá reakce a druhem použitého silanu. Co se týče výběru různých silanových reagentů, například v práci Sasou et al. (2003) se autoři přímo zaměřili na hledání optimálních podmínek pro silanizaci slídy různými alkoxysilany<sup>67</sup>. Pro methyltrimethoxysilan bylo nejvýhodnější množství reagentu připadající na jednotkový povrch slídy 0,035  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> a doba, po kterou probíhala silanizace v dusíkové atmosféře, byla dva dny. Silanizace proběhla při pokojové teplotě, RMS drsnosti takto silanizovaného povrchu byla (0,08±0,02) nm.

Při podobných optimálních stanovování podmínek pro silanizaci methyltriethoxysilanem a ethoxytrimethylsilanem experimenty ukázaly, že silanizovaný povrch nebyl ve srovnání s methyltrimethoxysilanizovaným povrchem tak kvalitní. Totéž platí pro silany, které mají molekulární strukturu prostorově rozlehlejší než methyltrimethoxysilan, například 3-aminopropyltrimethoxysilan, 3aminopropyltriethoxysilan a silany obsahující fenylovou skupinu. RMS těchto povrchů byla několik nanometrů a zobrazování DNA na takových substrátech bylo ve srovnání s methyltrimethoxysilanovým povrchem obtížnější (ve smyslu vzniku častých agregátů DNA). Slída silanizovaná methyltriethoxysilanem vykazovala RMS drsnosti povrchu  $(0,168\pm0,05)$  nm, methyltrimethoxysilan 0,08±0,02 nm, 3pro

<sup>&</sup>lt;sup>67</sup> Methyl-trimethoxysilan byl navázán na čerstvě odštípnuté slídě modifikovanou metodou "vapour APTES". Štěpení slídy i vlastní silanizace byla provedena v plastovém pytli (plastic glovebag) plněném plynným dusíkem. Stejná metoda byla použita pro ostatní reagenty. Kapka 2 μl roztoku λ-DNA (4,5 ng/μl v 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH 8,0) byla napipetována na povrch silanizovaného substrátu a poté jemně odsáta mikropipetou. AFM zobrazování bylo v TP-AFM ve vzduchu při pokojové teplotě.

aminopropyltriethoxysilan  $(0,11 \pm 0,03)$  nm a pro phenyltrimethoxysilan byla RMS  $(0,10\pm0,04)$  nm (Sasou et al. 2003).

V jiné studii Tätte et al. (2003) porovnali tři různé postupy přípravy silanizovaného povrchu. Použitým reagentem byl 3-aminopropyltrimethoxysilan, APTMS (98% v toluenu, Sigma, USA), který byl použit bez předchozí redestilace. Silanizovaný povrch byl připraven silanizací APTMS v acetonovém roztoku<sup>68</sup>, silanizací v lineárně polymerizovaném<sup>69</sup> APTMS (LPS-roztokem) a silanizací čistým<sup>70</sup> APTMS. Snímky naskenovaných povrchů jsou na obr. 30. Použitá slída byla vždy před silanizací ponechána na dvě hodiny v 2 M roztoku NaOH v 50% w/w vodném ethanolu. Poté byla opláchnuta čistou vodou a použita k silanizaci.

U jednotlivých povrchů byla srovnávána heterogenita a zrnitost. Povrch hydroxylované slídy silanizovaný v 2% acetonovém roztoku APTMS vykazoval velké nehomogenity, které ani snížení koncentrace APTMS na 10<sup>-4</sup>% úplně neeliminovalo (viz obr. 30, a) a b)). Ošetření slídy LPS-roztokem nebo čistým APTMS poskytovalo mnohem hladší povrch (viz obr. 30, c) a d)).

Při imobilizaci DNA<sup>71</sup> byl na povrchu slídy ponechán DNA roztok (50 μM roztok DNA ve 100 mM uhličitanovém pufru<sup>72</sup>, pH 9,0) inkubovat po dobou dvou hodin. Před AFM zobrazováním byly vzorky opláchnuty vodou.

<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> Silanizace roztokem APTMS: Hydroxylovaná slída byla ponechána na jednu minutu v 2% až 10<sup>-4</sup>% roztoku APTMS v 95% v/v vodném acetonu. Poté byl povrch slídy opláchnut acetonem, ponechán při pokojové teplotě na vzduchu dvanáct hodin a dvanáct hodin péct při 90 °C.

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> Silanizace lineárně polymerizovaným APTMS: Pro lineární polymeraci (LP) byla připravena směs vody (0,656°g) a APTMS (3,295°g), která byla míchána při 80 °C po dobu třiceti minut. Reakce byla ukončena přidáním methanolu (vysušený, redestilovaný) v úměrném množství tak, aby vzniklá směs byla vysoce viskózní. Pro vyloučení možnosti další polymerace byla směs sušena aezotropní destilací s heptanem. Velmi viskózní produkt byl rozpuštěn v 15 ml methanolu. K silanizaci bylo použito úměrné množství roztoku lineárně polymerizovaného silanu v methanolu (LPS-roztok), který byl přímo napipetován na povrch hydroxylované slídy. Takto nachystaná slída byla ponechána 12 h na vzduchu při pokojové teplotě a 12 h péct při 90 °C.

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> Silanizace čistým APTMS: roztok čistého APTMS byl napipetován na hydroxylovanou slídu. Takto nachystaná slída byla ponechána 12 h na vzduchu při pokojové teplotě a 12 h péct při 90 °C.

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> 5'-amino modifikovaný DNA oligonukleotid (Sigma-Genosys, UK).

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> Sodium carbonate/bicarbonate.



Obr. 30: Snímky silanizovaných povrchů, převzato z Tätte et al (2003).

- a) hydroxylovaná slída ponechána jednu minutu v 2% roztoku APTMS
- b) hydroxylovaná slída ponechána jednu minutu v 10<sup>-4</sup>% roztoku APTMS
- c) slída silanizovaná lineárně polymerizovaným APTMS v methanolu
- d) slída silanizovaná čistým APTMS

## Silanizace slídy použitím silatranu

Na rozdíl od APTESu používaného k modifikaci substrátů je 1-(3aminopropyl)silatran (APS, viz obr. 31) extrémně odolný k hydrolýze a polymeraci za neutrálního pH (Shlyakhtenko et al. 2003a).



Obr. 31: 1-(3-aminopropyl)silatran, APS.

V práci (Shlyakhtenko et al. 2003a) byl APS připraven by vypařováním směsi APTESu ve vakuu (vacuum evaporation). Směsi obsahovala 4,13 g triethanolamine, 1 mg sodium (katalyzátor) a 6,12 g APTESU při 60 °C, a byla ponechána odpařovat do doby, než byla dosažena konstantní hmotnost 6,4 g. Takto získaný produkt je možno použít k silanizaci substrátu bez dalšího přečištění. V článku použili 50 mM zásobní roztok APS v deionizované vodě, uchovaný v lednici při 4 °C bez dalších speciálních požadavků na uskladnění. K modifikaci slídy byl zásobní roztok rozředěn v objemovém poměru 1:300 v deionizované vodě, čerstvá slída byla ponořena do pracovního roztoku na dobu třiceti minut, opláchnuta jemně deionizovanou vodou, sušena argonem a následně uchována v argonové atmosféře do doby použití<sup>73</sup>. RMS APS-slídy zobrazené ve vodném roztoku bylo 0,15±0,03 nm, AP-slídy ("vapour metoda") 0,31±0,06 nm (Shlyakhtenko et al. 2003a). APS-slída byla použita také například v Riener et al. (2003).

### Kovalentní uchycení molekul DNA

Při uchycení molekuly DNA k zlatému substrátu Hegner<sup>74</sup> navázal DNA pomocí thiolové vazby na obou koncích molekuly. DNA byla uchycena k zlatému povrchu prostřednictvím 5-merkapto-hexanolové skupiny HS(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- na 5'-fosfátu DNA. Zbytek

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> Na APS-slídě byl zobrazován streptavidin-DNA komplex a plazmidová DNA (pCU19, pCW2966) při různých iontových podmínkách (TE pufr pH 7,6 až TE pufr s 200 mM NaCl).

<sup>&</sup>lt;sup>74</sup> Přečištěná DNA byla rozpuštěna v 10 mM TRIS-HCl pH 7,5 nebo 10 mM octanu amonném, uchovávána při 4 °C (nebyla zamražena), použitá koncentrace DNA byla 0,1  $\mu$ M, doba inkubace roztoku s DNA na substrátu 30–60 minut, k měření byl použit typ AFM - Nancoscope III, Digital Instrument. Měřeno v: voda, propanol, ethanol, pufr (10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub> nebo v 10 mM octan amonný s / bez 0,1  $\mu$ M DTT), konstanta tuhosti nosníku 0,08–0,17 N/m.

DNA byl ponechán volně pro případné interakce například s proteiny. Zlato jako substrát je chemicky inertní a zároveň přístupné pro chemisorpci přes thiolové vazby. Vazba Au-S je poměrně stabilní a protože thiolové skupiny mohou být navázány na biomakromolekuly DNA vhodnou modifikací, je tato metoda dosud používaná (Hegner et al. 1993, Hansen et al. 2004).

### Zobrazení chromatinových vláken

Nemodifikovaná očištěná krycí sklíčka byla také použita jako substrát v počátcích AFM, a to k uchycení chromatinu<sup>75</sup>(Allen et al. 1993). Velká pozornost musela být věnována oplachování sklíček (pro odstranění neuchyceného materiálu a solí), tento krok často odstranil ze substrátu i samotný vzorek. Vzorky byly poté vysušeny a ihned zobrazovány upraveným Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hrotem. Na AFM snímcích bylo možno rozlišit jednotlivá nukleozomální jádra. V článku jde o první snímky chromatinových vláken, snímky již dokonce poskytují informace o natěsnání DNA uvnitř nukleozomu (Allen et al. 1993). Další studie chromatinového vlákna lze najít například v (Bustamante at al. 1997a)



Obr. 32: AFM snímek chromatinového vlákna (převzato z Allen et al. 1993).

<sup>&</sup>lt;sup>75</sup> 3,78 kbp lineární fragment DNA (Lytechinus variegatus), obsahující nukleozomy byl rozpuštěn v 5 mM TEA-HCl, pH 7,0, 10 mM NaCl, 0,2 mM EDTA.Na<sub>2</sub> a 0,1% glutaraldehyd, byl nanesen na krycí sklíčko. Uzavřený kruhový chromatin byl nanesen na krycí sklíčko z roztoku 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA.Na<sub>2</sub> a 0,1 mM PMSF, pH 7,5. Koncentrace chromatinu byla 1–15  $\mu$ g/ml, roztok byl inkubován na krycí sklíčku 2–10 minut. Poté byla krycí sklíčka se vzorky lehce opláchnuta proudem deionizované vody, osušena a ihned zobrazována C-AFM ve vzduchu (při relativní vlhkosti 45±5 %).

Kolem roku 1995 již bylo rutinně zvládnuto zobrazování DNA na vzduchu, avšak zobrazení nukleových kyselin v roztocích bylo stále velmi obtížné, zejména kvůli slabé adsorpci vzorku k substrátu. Problém byl částečně vyřešen použitím nově vyvinutého tapping módu (TP-AFM), ve kterém mohou být zobrazeny i slabě přichycené molekuly. Nejzajímavějším výsledkem bylo pravděpodobně pozorování pohybu DNA v roztoku a enzymatické štěpení ssDNA deoxyribonukleázou I *in situ*<sup>76</sup>(Bezanilla et al. 1994). Strukturální změny DNA po navázání různých proteinů jsou základem pro kontrolu různých biologických procesů, zejména během transkripce, a proto byly kolem roku 1995 aplikace AFM na DNA využívány zejména ke studiu změn konformace DNA vyvolané navázáním různých proteinů (Shao et al. 1996). Prostřednictvím kontinuálních skenů téhož místa byla pozorována dynamika a enzymatická degradace slabě uchycené DNA na NiCl<sub>2</sub> ošetřené slídě. Strukturální změny DNA po navázání různých proteinů sledovali například Dame et al. (2003).

### Odlišné metody uchycení DNA k substrátům

Přestože v roce 1997 již byla rozlišena detailnější struktura DNA a DNAproteinových komplexů usazených na AP-slídě, vývoj nových metod modifikace substrátu použitelných k zobrazování DNA vzorků neustal.

V japonských laboratořích Tanigawa a Machida srovnávali kvalitu slídového povrchu upraveného sperminem (RMS povrchu 0,18 nm), spermidinem (RMS povrchu 0,19 nm) a 3- aminopropyltriethoxysilanem (RMS drsnosti povrchu 0,38 nm). Při ošetření slídového povrchu sperminem a spermidinem<sup>77</sup> byla čerstvá slída vystavena působení roztoku<sup>78</sup> o koncentraci 5-5.10<sup>-4</sup> mg/ml po dobu pěti minut za pokojové teploty, poté byla ponechána v pěti mililitrech deionizované vody a usušena proudem plynného dusíku. Pro získání AP-slídy byla použita metoda "vapour APTES" za pokojové teploty.

<sup>&</sup>lt;sup>76</sup> Zobrazení DNA adsorbované na substrátu v kapalině bez předchozího vysušení.

<sup>&</sup>lt;sup>77</sup> Počet uchycených DNA klesá s klesající koncentrací sperminu/spermidinu. Vhodné koncentrace pro spermin jsou v rozsahu 5.10<sup>-4</sup> až 5 mg/ml, pro spermidin 5.10<sup>-2</sup>–5 mg/ml. Počet uchycených molekul byl vždy větší pro povrch ošetřený sperminem než povrch ošetřený spermidinem (koncentrace reagentů v roztoku byla stejná). Tento rozdíl může být důsledkem odlišného počtu aminoskupin v reagentech, neboť spermin obsahuje čtyři aminoskupiny zatímco spermidinová molekula pouze tři.

<sup>&</sup>lt;sup>78</sup> V článku není bohužel uvedeno, zda jde o vodný roztok nebo roztok reagentu v organickém rozpouštědle.

K inkubaci byl použit roztok DNA nebo DNA-SpI komplexů (DNA-proteinový komplex), který byl ponechán na slídě po dobu pěti minut. Následovalo opláchnutí modifikovaného substrátu pěti mililitry deionizované vody a usušení proudem plynného dusíku.

Na jednotlivých modifikovaných površích byla zkoumána schopnost AFM mapovat vazebná místa na fragmentech lineární DNA, vyšetřovány byly také změny v terciální struktuře DNA<sup>79</sup> při působení zvyšující se iontové síly. Pro získání otevřené kruhové struktury plazmidu byl pUC19 inkubován s topoisomerázou I v pufru<sup>80</sup> po dobu jedné hodiny, za teploty 37°C.



Obr. 33: *a) spermin, N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan) b) speminidin, N-(3-Aminopropyl)-1,4-diaminobutan.* 

Při určování lokace vazebných míst byl použit SpI-DNA komplex. Vyhodnocovány byly histogramy distribuce vzdálenosti mezi centrem navázaného SpI a bližším koncem studovaného fragmentu DNA. Vazebné místo bylo detekováno na AFM snímcích a jednoznačně zmapováno použitím druhého DNA fragmentu o odlišné délce.

Při vyšetřování konformace nadšroubovice DNA byly vyhodnocovány oblasti s těsným vinutím vláken DNA a oblasti, ve kterých byla DNA v relaxované formě. Pro slídu ošetřenou sperminem byly oblasti s těsným nadšroubovicovým vinutím vláken mnohem větší než ty, ve kterých byla molekula relaxovaná. Pro získání plně relaxované formy DNA byla DNA ošetřena topoisomerázou I a na AFM snímcích byly pozorovány konformační změny vedoucí na otevřenou kruhovou DNA. Publikované výsledky ukazují, že slída ošetřená sperminem a spermidinem je vhodný substrát pro AFM zobrazování nadšroubovicové DNA (Tanigawa et al. 1997).

Během několika posledních let se tedy z mikroskopie atomárních sil stal velmi užitečný nástroj k analýze struktury nukleových kyselin. Aplikace AFM studií zahrnují

<sup>&</sup>lt;sup>79</sup> Nadšroubovicové vinutí DNA hraje klíčovou roli v genetických procesech v buňce.

<sup>&</sup>lt;sup>80</sup> 10 mM TRIS-HCL, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT(dithiothreitol).

skeny s vysokým rozlišením dvojité šroubovice, studium DNA-proteinových komplexů, analýzu dynamiky hydratovaných nukleových kyselin, studium konformace nukleozomů a jejich podstruktury, neobvyklých DNA struktur jako jsou například G-vlákna, stechiometrii DNA-proteinových komplexů, pohyb DNA molekul krátkých jen 300 párů bází ve vodných roztocích nebo například DNA-enzymových interakcí. AFM zobrazování statických DNA - enzymových interakcí poskytuje informace o lokaci enzymu na DNA a o vazebných úhlech, zatímco dynamické snímky DNA a aktivních enzymů ve vodných pufrech otevírají novou oblast výzkumu v enzymologii (Hansma et al. 1996).

## 3.2 Shrnutí aplikací AFM pro studium nukleových kyselin

AFM <u>topografické snímky DNA s vysokým rozlišením</u>, jsou publikovány v Mou et al. (1995), Maeda<sup>81</sup> et al. (1999), Fang and Hoh (1999), Nagami<sup>82</sup> et al. (2002).

<u>Studium změn v sekundární struktuře DNA</u> (zejména nadšroubovicového vinutí a kondenzace DNA). Změny v nadšroubovicovém vinutí v obecném smyslu byly vyšetřovány například v Okada et al. (1998), Lyubchenko<sup>83</sup> et al. (1997a), Hansma (2001), Sun et al. (2001), Nagami et al. (2002), konkrétní ovlivnění struktury DNA kationty přítomnými v pufrových roztocích bylo studováno například v Fang and Hoh (1998), Dahgren and Lyubchenko (2002) a Zheng et al. (2003<sup>84</sup>). AFM zobrazování v této souvislosti významně přispělo k porozumění konformačních změn a prokázalo, že

<sup>&</sup>lt;sup>81</sup> Režimem NC-AFM a TP-AFM byla pozorována ssDNA (M13mp18, 7 kpb) a dsDNA (pBlue Script II, 2 kpb). ssDNA byla rozpuštěna v 10 mM TRIS-HCl a 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, koncentrace ssDNA byla 20 μg/ml, dsDNA byla rozpuštěna ve vodě na konečnou koncentraci 10 μg/ml. Substrátem k uchycení byla neošetřená čerstvá slída. DNA byla uchycena ponecháním 1 μl roztoku DNA na několik minut na substrátu. Roztok s DNA byl odstraněn ze substrátu proudem vzduchu a vzorky byly po vysušení pozorovány ve vzduchu (TP-AFM v amplitudovém režimu) a ve vakuu (NC-AFM) AFM mikroskopem SPI 3700 (Seiko Instruments, Japan).

<sup>&</sup>lt;sup>82</sup> Nadšroubovicová struktura plazmidové DNA (pBR 322) byla pozorována po inkubaci DNA roztoku (10 mM TRIS-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) na čerstvě odštípnuté, ničím neupravené slídě. Roztok s DNA byl poté opláchut malým množstvím 0,2% roztoku uranyl acetate a osušen plynným dusíkem. Uranyl acetate fixuje konformaci DNA po její adsorpci na substrát (Pastré et al. 2003).

<sup>&</sup>lt;sup>83</sup> Terciální struktura nadšroubovice DNA byla zkoumána u DNA adsorbované z roztoků o různé iontové síle. V článku byla prezentována metoda uchycení DNA k substrátu bez vysušení vzorku před zobrazením v kapalině (AFM *in situ*). Toto bylo umožněno kombinací TP-AFM a použitím AP-slídy silanizované metodou "vapour APTES".

<sup>&</sup>lt;sup>84</sup> Na čerstvé slídě byla po vysušení inkubačního roztoku zobrazena kruhová plazmidová DNA (pBR 322) a lineární plazmid (pBR 322, 4361 bp, Sino Biogechnology, China). Zobrazení proběhlo ve vzduchu (v kapalině) režimem TP-AFM, NanoScope III (Digital Instrument, Santa Barbara, USA).

je velmi významnou nejen zobrazující metodou. Na rozdíl však od EM metoda AFM umožňuje vizualizovat DNA v přirozených podmínkách.

AFM skeny nukleových kyselin *in situ* (tj. pozorování molekul DNA v roztocích bez předchozího vysušení) ukazují, že DNA molekuly zobrazené v pufru o nízké iontové síle jsou zřídka rozvětvené s nepravidelným tvarem. Plektonemické vinutí nadšroubovice se formuje při vysoké koncentraci iontů v roztoku (tedy za podmínek blízkých fyziologickým). Lyubchenko et al. (1997) zobrazoval plazmidovou DNA, kdy molekuly vykazovaly při velké iontové síle nejčastěji tvar osmičky (cca 80%), zatímco v pufru o nízké iontové síle byl převážně v relaxovaném stavu<sup>85</sup>. Při zobrazení ve vzduchu byly u molekul DNA (adsorbované z pufru o velké iontové síle) pozorovány stejné strukturní konformace jako v případě *in situ*. Také u DNA molekul adsorbovaných na AP-slídu (z pufru o nízké iontové síle byly pozorovány podobné konformace jako při odpovídajícím zobrazení *in situ*. Je tedy možno předpokládat, že DNA molekuly zůstávají na místě kde byly adsorbovány zřejmě ve stejné konformaci, aniž by je příliš ovlivnil vysoušecí krok při přípravě vzorku. (Lyubchenko 1997a).

Zobrazování DNA-proteinových komplexů patří mezi jedny z nejznámějších aplikací AFM zobrazování. AFM může tyto komplexy vizualizovat na vzduchu po vysušení nebo za fyziologicky blízkých podmínek v kapalinách. Studie protein-DNA komplexů na jednotlivých molekulách DNA umožnily exaktně ukázat specifitu nebo nespecifitu zkoumaných komplexů, změny vazebných úhlů a lokalizaci navázaných proteinů na DNA (Bustamante and Rivetti 1996). Jak už bylo zmíněno dříve, AFM umožňuje vizualizovat také strukturální změny na DNA způsobené vazebnými proteiny (např. v Dame<sup>86</sup> et al. 2000).

<u>Výroba DNA biosenzorů</u> V poslední době například vědci z IBM oznámili, že vyvíjí senzory k identifikací genových mutací. DNA vlákna imobilizovaná na povrchu nosníku reagují specifickým způsobem (závislým na shodě či neshodě v

<sup>&</sup>lt;sup>85</sup> Relaxovaný stav plazmidové DNA znamená kruhovou strukturu (tvar) uzavřeného vlákna DNA.

<sup>&</sup>lt;sup>86</sup> Protein použitý v této studii byl H-NS (*Escherichia coli*). Tento protein je zapojený do genových přenosů a svinování DNA. Roztok plazmidu pUC19 nebo směs plazmidu a proteinu (vlastní příprava) byl získán rozpuštěním zásobních roztoků v 5 mM HEPES, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM KCl a ponechán inkubovat na čerstvé slídě. Po dvaceti vteřinách byl roztok ze slídy jemně opláchnut HPLC vodou (Sigma). Přebytek roztoku byl odsát v rozích filtračním papírem a slída byla sušena pomalým proudem filtrovaného vzduchu. Získaná frekvence byla 1 molekula komplexu/μm<sup>2</sup>. Snímky byly získány prostřednictvím NanoScope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) v TP-AFM režimu na vzduchu.

komplementaritě vláken DNA obsažených v zobrazujícím roztoku) s DNA rozptýlenou v zobrazujícím roztoku (Fritz et al. 2000).

<u>Měření silových interakcí mezi komplementárními vlákny DNA</u> například v Lee et al. (1994<sup>87</sup>), Zlatanova et al. (2000), Ling et al. (2004).

<u>Sledování destrukce DNA způsobené γ-zářením</u>. Radiace je považována za jedenu z nejdůležitějších příčin smrti buněk, protože způsobuje poškození DNA. Murakami et al. (2000, 2001) analyzoval degradaci tří forem plazmidové DNA (PBluescript II KS+) - uzavřený kruhový plazmid (intaktní DNA), otevřený kruhový plazmid (DNA s poškozením jednoho vlákna) a lineární formu (DNA s poškozenými oběma vlákny). Autor zdůrazňuje, že torzní rysy plazmidové DNA byly zobrazeny lépe s AFM než s TEM a strukturální změny DNA byly rozeznány s nanometrovým rozlišením.

<u>Studium dynamických jevů DNA</u> V článcích bývá metodou AFM pozorována zejména dynamika polymerázového komplexu na různých fragmentech DNA (cca 10<sup>3</sup> bp), je zobrazován proces navázání a vyvázání specifických proteinů nebo například RNA polymerázového komplexu (Guthold 1994, Shlyakhtenko et al. 1998<sup>88</sup>, Umemura et al. 2000, Abdelhady et al. 2003<sup>89</sup>, Lyubchenko et al. 2004<sup>90</sup>)

<sup>&</sup>lt;sup>87</sup>V tomto experimentu byla měřena velikost interakce mezi vlákny DNA. Použita byla komplementární vlákna SH - (ACTG)<sub>5</sub> a SH - (CAGT)<sub>5</sub> Vlákna DNA byla kovalentně přichychycena přes thiolovou vazbu k povrchu substrátu a komplementární vlákna DNA k sférickému hrotu. Povrch modifikovaného hrotu byl přibližován k modifikovanému povrchu substrátu. Do vzdálenosti větší než pět nanometrů byla detekovaná interakce zanedbatelná. V oblasti od 5 nm a míň docházelo k přískokům, kdy se oba povrchy dotýkaly díky nespecifickým povrchovým silám. Další přibližování obou povrchů vedlo ke vzniku repulsivních sil. Při oddálení povrchů od sebe byla pozorována významná hystereze, v důsledku adhezivních sil (1,65 nN) (Lee et al. 1994).

<sup>&</sup>lt;sup>88</sup>Plazmidová DNA(pUC8F14C) v TE pufru obsahujícím 1 mM MgCl<sub>2</sub> byla nanesena na štěpenou slídu ("ruby mica") na deset sekund a opláchnuta lehce ultračistou vodou. Vzorek byl poté vysušen proudem plynného dusíku a uchován exsikátoru. Zobrazován byl v kapalině a na vzduchu režimem C-AFM.
<sup>89</sup>V tomto článku byla pozorována přímá degradace DNA komplexu (pBR 322) vystaveného DNAaze I,

<sup>&</sup>lt;sup>89</sup>V tomto článku byla pozorována přímá degradace DNA komplexu (pBR 322) vystaveného DNAaze I, AFM vybavení: NanoScope III (Digital Instrument, Santa Barbara, USA), oxide sharpened silicon nitride tips (Veeco, Santa Barbara, CA, TP-AFM.

<sup>&</sup>lt;sup>90</sup>Bylo demonstrováno připojení RNA polymerázy na DNA (vznikl tak RNAP-DNA komplex) v reálném čase. Současně se autorům povedlo vizualizovat posun polymerázy podél DNA. Posun zahrnuje jak difůzi RNA polymerázy podél vlákna DNA tak přeskoky enzymů mezi jednotlivými místy na vlákně DNA (Lyubchenko et al. 2004).
<u>Vyšetřování elasticity a tuhosti NA</u> (viz obr. 34) jsou uvedené například v Lee et al. (1994), Hansma et al. (1995<sup>91</sup>, 1996), Baumann et al. (2000), Bustamante et al. (2000), Nony et al. (2001<sup>92</sup>), Morii et al. (2004).



Obr. 34: Schéma přímého měření sil nezbytných k rozbalení (unfold) struktury biomolekuly. Biomolekula je kovalentně navázána k substrátu a AFM hrotu.

<u>Izolace části nukleové kyseliny z vlákna DNA</u>. Mapování sil na plazmidové DNA molekule mikroskopem atomárních sil ukázalo, že při použití středně kyselých roztoků se zvyšuje adhezní síla mezi Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hrotem a vlákny DNA. Díky těmto adhezním silám může být plazmid DNA odtržen z povrchu slídy a případně použit k dalším účelům (Xu<sup>93</sup> and Ikai 1998).

<u>Příprava a vizualizace DNA sítí</u>. Za určitých podmínek (např. vysoká koncentrace DNA v roztoku) může DNA adsorbovaná na pevném podkladu vytvářet plošné sítě. Tyto byly zobrazovány například v et al. (2001, 2005), Xiao et al. (2003), Hansma et al. (2004). V posledních několika letech se DNA molekuly staly díky svým specifickým vlastnostem v rámci vytvořených sítí středem zájmu při výrobě nanostruktur.

<sup>&</sup>lt;sup>91</sup>Pokrok nezobrazovací AFM zahrnuje využití silových křivek k měření mezimolekulárních sil, silovému mapování a měření pohybu proteinů (Hansma 1996).

<sup>&</sup>lt;sup>92</sup> Za různých iontových podmínek byly měřeny parametry elastičnosti DNA.

<sup>&</sup>lt;sup>93</sup> Pro AFM vzorky byla DNA rozpuštěna v HEPES-Mg pufru, pH 7,5 (50 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) na konečnou koncentraci 1 ng/ $\mu$ l. Inkubace roztoku na čerstvé slídě byla 5 - 10 minut, při 60 C. 1  $\mu$ l tohoto rozoku byl napipetován na střed čerstvé slídy. Po dvou minutách inkubace byla slída lehce opláchnuta proudem 2-5 ml Milli-Q vody, sušena stlačeným vzduchem a potom třicet minut a více uchována ve vakuu. Do doby než byly zobrazovány byly vzorky uchovány v Petriho miskách.

# 4 <u>Cíle diplomové práce</u>

- > Vypracovat přehled biologických aplikací AFM.
- Zpracovat přehled problematiky na užití konkrétních metodik k uchycení nukleových kyselin.
- Zavést metodiku uchycení nukleových kyselin prostřednictvím kationtů nebo vhodnou silanizací do praxe a zobrazit topografii plazmidové DNA přístrojem Explorer AFM.
- Zobrazit thylakoidy metodou AFM.
- Zhodnotit AFM snímky plazmidové DNA s výsledky publikovanými v odborné literatuře.

## 5 Experimentální část

V této diplomové práci byly biologické vzorky zobrazovány přístrojem Explorer AFM (ThermoMicroscopes, USA, firma dnes spadá pod Digital Instruments, Veeco Metrology Group, Santa Barbara, USA). AFM přístroj se skládá (vyjma elektroniky) z měřicí části a podstavce, viz obr. 35 a 37.



Obr. 35: Měřicí hlava a podstavec přístroje Explorer AFM.

Měřicí část obsahuje skener, laser, fotodetektor a všechny nastavovací prvky (laser, poloha zrcátka). Podstavec slouží k uchycení vzorku na magnetický stolek, k hrubému posunu vzorku ve vodorovné rovině (x, y) a k mechanickému upevnění měřicí části AFM přístroje. Vzorek v centru AFM měřicího přístroje je možno sledovat pomocí CCD kamery, zorné pole má velikost 1,5 mm x 1,5 mm a je sledováno pod úhlem 45° se zvětšením 100x. Osvětlení pole zajišťuje malá žárovka.

Požadavky na prostředí, ve kterém jsou vzorky skenovány jsou minimální, výrobce doporučuje pracovní teplotu 15-20 °C se stabilitou  $\pm 2$  °C/hod, relativní vlhkost pod 60% a minimalizovat vibrace.



Obr. 36: Uspořádání přístrojů v laboratoři.

Explorer AFM obsahuje ve svém příslušenství dva skenery ("malý" a "velký") pro aplikace v suchém prostředí (dry scanner, obr. 39) a dva skenery ("malý" a "velký") uzpůsobené pro skenování v kapalném prostředí (liquid scanner, obr. 38). Maximální oblast, kterou je možno naskenovat malým skenerem, je 2  $\mu$ m x 2  $\mu$ m, maximální oblast, kterou je možno naskenovat velkým skenerem, je 100  $\mu$ m x 100  $\mu$ m. Naměřená data byla získána malým skenerem pro suchá prostředí a malým skenerem pro zobrazování v kapalinách, konkrétní typ skeneru je uveden u popisu obrázku.

Explorer AFM s uvedenými skenery může poskytnout topografické snímky v C-AFM, NC-AFM a TP-AFM režimu, vzorky je možno snímat také v režimu laterálních sil, silové spektroskopie, fázového zobrazování a po přikoupení kompatibilních skenerů také v režimech magnetické mikroskopie či tunelovací mikroskopie.



Obr. 37: Schéma uspořádání AFM měřicího zařízení.



Obr. 38: Skenery příslušné k Explorer AFM - pro kapalná prostředí.
a) Velký skener (100 μm x 100 μm v rovině (x, y), 8 μm v ose z)
b) Malý skener (2 μm x 2 μm v rovině (x, y), 0,8 μm v ose z)



a)

b)

Obr. 39: Skenery příslušné k Explorer AFM - pro suchá prostředí.

- a) Velký skener (100 µm x 100 µm v rovině (x, y), 10 µm v ose z)
- b) Malý skener (2  $\mu$ m x 2  $\mu$ m v rovině (x, y), 0,8  $\mu$ m v ose z)

Pro snadnější manipulaci při nastavování parametrů AFM měřicího přístroje a vyhledávání vhodných míst na zkoumaném vzorku je laboratoř vybavena i optickým mikroskopem Olympus IX-70 s adaptérem pro AFM mikroskop, obr. 40. Optický mikroskop Olympus je přizpůsobený k zobrazení nosníku s hrotem a velmi usnadňuje především správné nastavení laseru procházejícího kapkou uchycenou na hrotu při zobrazování v kapalném prostředí.

Jak již bylo zmíněno dříve, pro kvalitní snímky skenovaného vzorku je nezbytné izolovat AFM měřicí systém od okolních vibrací. V naší laboratoři je toho docíleno umístěním AFM měřicího systému na antivibračí stůl a přiklopením AFM měřicího systému speciálním krytem.



Obr. 40: Optický mikroskop Olympus IX-70 v kombinaci s Explorer AFM.

## 5.1 <u>Materiál a metody</u>

Jako substrát byla ve všech experimentech použita komerčně dodávaná slída (muskovit, grade-V, SPI Suplies), v dílčích experimentech byla také použita krycí sklíčka (Fisher Scientific).

Pro přípravu všech pufrových roztoků byla použita deionizovaná voda (Aqual 45, Merci) s výstupní měrnou vodivostí 0,1 μS.cm<sup>-1</sup>. Tato voda byla také použita při oplachování vzorků i při závěrečném oplachování použitého skleněného nádobí<sup>94</sup>.

K silanizaci substrátu byl použit 3-aminopropyltriethoxysilan (98% APTES redestilovaný v argonové atmosféře byl poskytnut jako dar od prof. Vetterla; biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 193, Brno a 98% APTES, Sigma-Aldrich, byl použit k silanizaci bez předchozí redestilace). APTES je nutné uchovávat v intertní atmosféře při cca 4 °C, aby bylo zabráněno hydrolýze a polymeraci APTESu. Proto byl zásobní roztok APTESu rozpipetován po cca 2 ml do malých zásobních plastových lahví plněných argonem, kdy takto nachystané frakce byly uchovány v ledničce (při cca 4 °C) v exsikátoru plněném argonem.

K silanizaci substrátu byla použita vždy frakce APTESu z jedné plastové lahve, ne starší než jeden týden od otevření lahve.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na AFM zobrazení nukleových kyselin. Plazmidová dsDNA, pRW 3822, byla poskytnuta jako dar od prof. Vetterla (biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 193, Brno). Tento plazmid byl připraven tak, že do plazmidu pSPL3 (7150 pb) byl vklonován inzert (GAA)<sub>150</sub>. Celkově je pRW 3822 větší oproti plazmidu pSPL3 o 450 pb, tedy 7 570 pb. Délka zobrazované plazmidové DNA je 7570 pb x 0,338 nm, tedy cca 2 560 nm.

Zásobní roztok poskytnuté nukleové kyseliny byl naředěn v různých pufrových roztocích na konečnou koncentraci 4 µg/ml. Použité purfové roztoky byly tyto:

- uhličitanový pufr (100 mM NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,0)
- HEPES-Mg pufr (40 mM HEPES-KOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6)
- TRIS pufr (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH 7,6).

<sup>&</sup>lt;sup>94</sup> Použité skleněné nádobí bylo oplachováno pouze běžnými saponátovými prostředky (jar), destilovanou vodou a deionizovanou vodou.

Pracovní roztok nukleové kyseliny byl rozpipetován do jednotlivých mikrozkumavek (objem roztoku cca 400  $\mu$ l) zamražených při –20 °C. Před nanesením na substrát byl roztok DNA vždy inkubován při cca 35 °C po dobu minimálně 30 min.

Inkubace DNA na substrátu proběhla tak, že roztok DNA (4  $\mu$ g/ml) byl napipetován přímo na substrát v množství cca 40-100  $\mu$ l. U hydrofobních silanizovaných povrchů byl roztok DNA napipetován na deionizovanou vodou opláchnutý čtvereček parafilmu a slídový substrát byl na kapku roztoku na parafilmu přiklopen shora (viz obr. 41). Po skončení inkubace byl roztok s neuchycenými molekulami DNA z povrchu substrátu opláchnut proudem 2–5 ml deionizované vody (pufrového roztoku). Substrát byl poté buď ponechán uschnout na vzduchu v uzavřených Petriho miskách, případně byl osušen proudem argonu a nebo byl ihned po inkubaci zobrazován v kapalině.



Obr. 41: Nákres inkubace vzorku.

Suspenzi thylakoidů pro AFM zobrazení poskytla Mgr. Iva Šnyrychová. Thylakoidy byly extrahovány ze špenátu (*Spinacia oleracea*) dle Hidegové<sup>95</sup> (Methods in Molecular Biology, vol. 274, 249-260.). Zásobní roztok thylakoidů měl koncentraci chlorofylu 5119 µg/ml a byl dále rozředěn resuspendačním pufrem na pracovní roztoky o koncentraci chlorofylu 5,11 µg/ml, 0,51 µg/ml a 0,05 µg/ml. Takto připravené roztoky obsahující thylakoidy byly při přípravě vzorků naneseny na slídový substrát a po vysušení slabým proudem argonu zobrazovány AFM na vzduchu.

<sup>&</sup>lt;sup>95</sup> Množství 125 g špenátu bylo homogenizováno v homogenizačním pufru (50 mM MES, pH 7,2, 400 mM sacharóza, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM askorbát sodný), přefiltrováno přes uhelon a centrifugováno (15 min při 7000 x g – použit pelet, 5 min při 300 x g – použit supernatant, 15 min při 7000 x g – použit pelet). Pelet byl resuspendován fosfátovým pufrem (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 200 mM sacharóza, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM askorbát sodný).

## 5.1.1 Úprava substrátů

Jako primární substrát byla použita vždy čerstvě odštípnutá slída nebo krycí sklíčka očištěná od kontaminací. Čerstvá slída byla připravena vtlačením špičky pinzety do bločku slídy a odtržením naštípnuté svrchní slídové vrstvy.

Sklo bylo pro očištění od kontaminací ponecháno v "piraňa roztoku" (70%  $H_2SO_4$ : 30%  $H_2O_2$ , v/v 4:1) po dobu půl hodiny. Poté bylo ponecháno dvakrát vždy v novém roztoku deionizované vody (cca 5 ml) po dobu pěti minut, opláchnuto deionizovanou vodou (cca 2 ml) a ponecháno uschnout při pokojové teplotě v uzavřených Petriho miskách nebo osušeno slabým proudem argonu.

## Použití čisté slídy

### Varianta 1

Na čerstvě odštípnutý nemodifikovaný slídový povrch bylo napipetováno cca 40  $\mu$ l roztoku plazmidové DNA (pRW 3822, 4  $\mu$ g/ml) v uhličitanovém pufru a inkubováno<sup>96</sup> v uzavřených Petriho miskách 15 minut. Poté byl DNA roztok z povrchu slídy opláchnut proudem deionizované vody (nebo uhličitanovým pufrem) a povrch slídy byl ihned zobrazován v uhličitanovém pufru.

### Varianta 2

Na čerstvě odštípnutý nemodifikovaný slídový povrch bylo napipetováno 40  $\mu$ l roztoku DNA (pRW 3822, 4  $\mu$ g/ml) v HEPES pufru a inkubováno v uzavřených Petriho miskách po dobu 15 minut. Poté byl roztok z povrchu slídy opláchnut proudem deionizované vody, slída byla osušena proudem argonu a uchována v argonové atmosféře, než byl vzorek zobrazován.

Pro hydroxylaci před AP-úpravou byla čerstvě odštípnutá slída ponechána dvě hodiny v čerstvém roztoku 2 M NaOH v 50% w/w vodném ethanolu. Poté byla opláchnuta cca 3 ml deionizované vody a ponechána uschnout v uzavřených Petriho miskách při pokojové teplotě. Takto připravený slídový povrch byl dále použit k silanizaci APTESem. V některých experimentech byl tento krok úpravy slídy vynechán.

<sup>&</sup>lt;sup>96</sup> Při přípravě vzorků (uvedených v experimentální části této diplomové práce) byla při inkubaci vždy dodržena pokojová teplota.

## Slída upravená Mg<sup>2+</sup> kationty

Čerstvě odštípnutá slída byla ponořena přes noc v roztoku 33 mM octanu hořečnatého při pokojové teplotě. Poté byla vystavena ultrazvuku (35 kHz) 5 minut v deionizované vodě a osušena stlačeným vzduchem. Roztok DNA v uhličitanovém pufru byl nanesen na parafilm (cca. 40 µl) a aktivovaná slída byla shora přiklopena na roztok DNA na parafilmu. Doba inkubace DNA byla 5–15 minut. Poté byla slída opláchnuta proudem deionizované vody (cca 3 ml) a ponechána uschnout při pokojové teplotě v uzavřených Petriho miskách. Povrch takto upravené slídy byl ihned zobrazován suchým AFM skenerem nebo skenerem pro kapalná prostředí (metodika převzata z Li et al. 1992, Hansma et al. 1992, Vesenka et al. 1992).

## Slída modifikovaná metodou "liquid APTES"

## Varianta 1

Hydroxylovaná slída byla ponechána po dobu jedné minuty v 1% - 0,001% v/v roztoku APTESu v 95% v/v vodném acetonu. Roztok APTESu byl vždy čerstvě připraven před vlastní silanizací (obvykle během inkubace slídy v roztoku NaOH). Po jedné minutě inkubace byla silanizovaná slída vyjmuta z roztoku APTESu, opláchnuta proudem cca 3 ml acetonu, 2 ml deionizované vody a ponechána v uzavřených Petriho miskách při pokojové teplotě po dobu 12 h. Poté byly Petriho misky se silanizovanou slídou ponechány v pícce při 90 °C po dobu dalších 12 h (metodika byla inspirována články Lyubchenko et al. 1992a, Saal et al. 2002, Tätte et al. 2003).

### Varianta 2

K silanizaci byla použita čistá, čerstvě odštěpená slída (tj. bez předchozí hydroxylace v NaOH), ostatní body v postupu ve variantě 1 byly zachovány.

### Varianta 3

Při silanizaci touto metodou byl použit aceton (98%, Lachema). Použita byla hydroxylovaná i čerstvě odštěpená slída.

Varianta 4

Při silanizaci touto metodou byla použita nehydroxylovaná slída, k silanizaci byl použit bezvodý aceton (98%, Lachema). Po vyjmutí z APTESového roztoku a opláchnutí byl na silanizovanou slídu ihned nanesen roztok s DNA (tj. bez předchozí úpravy 12 h na vzduchu při pokojové teplotě a 12 h pečení při 90 °C).



Obr. 42: Schématický nákres přípravy AP-slídy metodou "liquid APTES".

## Slída modifikovaná metodou "neat APTES"

Na hydroxylovanou slídu byl nanesen roztok čistého APTESu (98%, dar od prof. Vetterla), množství cca 20 µl. Slída byla takto ponechána v uzavřených Petriho miskách při pokojové teplotě po dobu 12 h. Poté byly Petriho misky se silanizovanou slídou ponechány v pícce při 90 °C po dobu dalších 12 h. Silanizovaný substrát byl poté opláchnut deionizovanou vodou pro odstranění neuchycených silanových molekul a zobrazován v uhličitanovém pufru.



Obr. 43: Schématický nákres přípravy AP-slídy metodou "neat APTES".

## Sklo a slída modifikované metodou "vapour APTES"

## Varianta 1

Čerstvě odštípnutá slída (očištěné krycí sklo) byla upevněna na stěny horního víka skleněného exsikátoru. Použitý exsikátor byl vybaven výpustným kohoutem a obsahoval jako vysoušedlo přesušený silikagel. Na dno porcelánové desky byla vložena mikrozkumavka bez víčka, která obsahovala 30 µl čistého APTESu (98%, Sigma). Po vložení slídy (skla) a APTESu byl z exsikátoru vodní vývěvou odčerpán vzduch ( po dobu cca 15 minut) a napuštěn argon. Slída (sklo) byla takto ponechána po dobu jedné až dvou hodin. Poté byla slída (sklo) vyjmuta a silanem modifikovaný povrch substrátu byl ihned použit k nanesení roztoku DNA v TRIS a HEPES-Mg pufru.

## 5.2 AFM zobrazování

Substráty připravené výše uvedenými metodami byly zobrazovány přístrojemExplorer AFM, malým skenerem pro kapalná prostředí nebo malým skenerem pro zobrazování v suchém prostředí. Topografie povrchu byla měřena nejčastěji v režimu TP-AFM, pro srovnání kvality u některých snímků také v NC-AFM a C-AFM. Hroty používané k AFM zobrazování byly zakoupeny u společnosti Veeco Metrology Group, typ 1560 (TappingMode Etched Silicon Probes, viz obr. 44).

nominální hodnota rezonanční frekvence	320 kHz
nosníku	
nominální hodnota konstanty tuhosti	42 N/m
nominální hodnota tloušťky nosníku (t)	4 μm
nominální hodnota šířky nosníku (w)	30 µm
nominální hodnota délky nosníku (L)	120 μm
materiál nosníku / hrotu	anitmonem dotovaný Si / Si
geometrie hrotu	nepravidelná
výška hrotu	10 μm - 15 μm
čelní úhel, zadní úhel, boční úhel	25,0°; 15,0°; 22,5°
nominální hodnota koncového poloměru hrotu	pod 10 nm
maximální hodnota koncového poloměru hrotu	15 nm

Tab. 3: Přehled parametrů charakterizujících měřicí sondu (tj. hrot s nosníkem).



Obr. 44: Snímky měřicích sond (převzato z Veeco Metrology Group).

- a) snímek nosníku s hrotem
- *b) detail hrotu*
- *c) definice parametrů nosníku*

Před vlastním měřením by měl být počítač příslušný k AFM měřicímu systému delší dobu zapnutý (cca 45 min), aby se systém tepelně ustálil. Před zapnutím přístroje je nutno upevnit a zapojit do AFM měřicího systému vhodný skener a na magnetický držáček skeneru správně umístit vybraný typ nosníku.

Při zapnutí je spuštěn ovládací program, který nejprve vyzve k potvrzení výběru zapojeného skeneru a umožní přivedení napájecích napětí (při nesprávné volbě možnost zničení skeneru) a ovládání mikroskopu (krokový motorek, laser). Poté je možno přepnout program do režimu sběru dat. V místnosti, ve které probíhá AFM měření, by měla být stálá teplota bez vzdušných proudů s vyhovující vlhkostí (určitá minimální vlhkost je nezbytná pro odvod náboje vznikajícího třením hrotu o vzorek při zobrazování na vzduchu). Prostředí by mělo být dále bez zbytečných vibrací (na AFM snímcích se projeví i posun židle). Před měřením je vhodné zkontrolovat stav tlaku v antivibračním stole a případně tlak doplnit kompresorem.

Před měřením je nutno nastavit stopu laseru tak, aby svítil na volnou špičku nosníku. Nastavování se provádí pomocí dvou štroubů, které vychylují stopu v navzájem kolmých směrech. V programové části, v režimu SUM je zobrazen celkový proud procházející fotodetektorem. Proud musí překročit mezní hodnoty dané typem nosníku (pro kontaktní režim cca 18 nA, pro bezkontaktní 6 nA). Je-li laser správně nastaven a signál je dostatečně silný, je nutno ještě vyvážit fotodetektor.

Po nastavení měřicího systému je třeba upenit vzorek na držák vzorků umístěný pod AFM měřicím systémem. Nedrží-li vzorek samostatně, je dobré jej uchytit oboustrannou páskou k podložnímu plíšku. Je-li vzorek správně upevněn, je možno umístit na držák vzorků AFM měřicí systém (při manipulaci je nezbytné, aby byl hrot dostatečně vysoko nad vzorkem a nedošlo k jeho poškození). Po opatrném usazení měřicího systému je další posun hrotu k povrchu vzorku ovládán příslušným software. Program umožňuje sběr čtyř signálů: topografie, napětí *z*-piezokeramiky, laterální síly či chybový signál. U všech signálů je možno volit sběr obrazu při pohybu skeneru v rastru vpřed (forward) či zpět (reverse) či oba současně.

Po vybrání měřeného signálu je nezbytné nastavit ostatní parametry skenování (počet řádků v obraze, skenovací rychlost, parametry zpětné vazby a hodnotu proudu, kterou bude udrzována zpětná vazba ) a samozřejmě režim, ve kterém proběhne AFM skenování, C-AFM nebo NC-AFM (TP-AFM je realizován volbou měřicí frekvence na opačné straně píku rezonanční frekvence než v NC-AFM měření).

#### 5.2.1 Zobrazování v suchém prostředí

Při zobrazování na vzduchu byl vzorek uchycený na substrátu umístěn na držák vzorků a shora přiklopen AFM měřicím systémem vybaveným malým skenerem pro zobrazování v suchém prostředí. Nastavení laserového paprsku, stejně jako ostatních parametrů bylo provedeno před přiklopením AFM měřicího systému a poté znovu zkontrolováno.

### 5.2.2 Zobrazování v kapalině

Při zobrazování v kapalném prostředí byl substrát se vzorkem zespoda upevněn oboustrannou izolepou na držák vzorků. Byl-li při přípravě vzorků substrát osušen, bylo do středu substrátu naneseno malé množství kapaliny (pufru), cca 20-60 µl. Stejná zobrazovací kapalina byla napipetována na nosník s hrotem (upevněný na malý skener pro kapalná prostředí v AFM měřicím systému) a byla ponechána z něj viset ve formě kapky. Měřicí systém byl poté přenesen na adaptér v jádru optického mikroskopu Olympus IX-70 a bylo provedeno nastavení laserového paprsku procházejícího visící kapkou, stejně jako ostatních parametrů přístroje. Poté byl měřicí systém opatrně přenesen nad substrát a shora přiklopen na substrát s kapalinou. Nedošlo-li ke spojení obou kapalin (kapky na nosníku s hrotem a kapky ve středu substrátu) ani po přiblížení sondy k substrátu, bylo opatrně přidáno malé množství kapaliny.

Při zobrazování v kapalinách je nezbytné precizně kontrolovat množství použité zobrazovací kapaliny (pufru). Přebytek kapaliny se obvykle dostane mezi substrát a izolepu a tím uvolní skenovaný substrát, čímž znemožní další skenování. Nedostatek zobrazovací kapaliny obvykle způsobí vychýlení laserového paprsku, čímž také znemožní další AFM zobrazování. V našem případě se osvědčilo napipetovat 20 µl kapaliny na nosník s hrotem (pro správné nastavení laserového svazku prostřednictvím optického mikroskopu) a 10 µl na substrát v případě, že byl substrát po inkubaci vzorku vysušen.

Při AFM zobrazování je nezbytné dbát na dobrou tepelnou rovnováhu mezi vzorkem, zobrazovací kapalinou a AFM měřicím systémem. Při našem zobrazování byla vždy použita kapalina pokojové teploty, aby byla zajištěna dobrá tepelná rovnováha mezi vzorkem, zobrazovací kapalinou a AFM měřicím systémem, která je důležitá pro stabilitu hrotu (Morris, Kirby, Gunning; Atomic force microscopy for biologists, 2001).

### 5.2.3 Analýza naměřených dat

Při měření je třeba rozlišovat dva směry pohybu. Prvním je skenování v rovině (x, y), kterým se sonda pohybuje po ploše vzorku Teoreticky se sonda může pohybovat jakkoliv, v praxi se využívá řádkování. Sonda se pohybuje napřed ve směru osy +x zleva doprava po jednom řádku (y=konst.) a pak se posune ve směru y a pohybuje se ve směru -x. Tento způsob sběru dat je výrazně ovlivněn hysterezí skeneru a proto se při měření sestavují nejčastěji dva obrazy, nezávisle na sobě jeden ve směru +x (forward) a druhý ve směru -x (reverse). Druhý pohyb je realizován jen tehdy, neměříme-li v režimu s konstantní výškou. Pak je třeba pohybovat sondou i ve směru osy z, a to v závislosti na hodnotě skenované veličiny. Používáme-li oscilační režim (NC-AFM a TP-AFM), slouží skener zároveň k buzení kmitů.

Jen málokdy se podaří umístit plochý vzorek tak, aby byl rovnoběžný se skenovací rovinou. Proto je vhodné pokusit se naměřenými daty proložit rovinu a tu odečíst. Tím získáme pouze topografický obraz. Software nabízí proložení dat vhodnou rovinou, která je určována metodou nejmenších čtverců. Protože substrát obecně také nemusí být rovný, software umožňuje proložení a odečtení i zakřivených ploch (až do třetího řádu). U všech uvedených snímků byla naměřená data proložena plochou prvního nebo druhého řádu.

Někdy je také vhodné zasáhnout do naměřených dat, pokud obsahují zřejmé vady. Mezi nejdůležitější patří ostré špičky (vzniklé na nečistotách nebo impluzním šumem), šmouhy ve směru skenování (vzniklé zachycením slabě vázané nečistoty, u biologických aplikací jde často o části vzorku) a skoky v intenzitě obrazu (jev vzniká náhlou změnou vlastnostní hrotu, například se kousek hrotu ulomí nebo vrchol hrotu změní tvar). Tyto vady lze s různým efektem softwarově odstranit pomocí příslušného software. U naměřených dat, která byla softwarově zpracována, je toto uvedeno v popisu obrázku.

Výsledné snímky (ať už softwarově zpracovaná, nebo originální data) lze jednoduše exportovat v obrázkové podobě (nabídka formátů TIF, JPG, WMF apod) nebo v číslicovém maticovém záznamu. 2D a 3D AFM snímky (uvedené v kapitole 6 Výsledky měření, 7 Diskuze AFM snímků plazmidové DNA, 8 Diskuze AFM snímků thylakoidů) byly vytvořeny prostřednictvím software, dodaným s AFM vybavením a byly exportovány do WMF formátu.

# 6 Výsledky měření

Protože AFM zobrazování objektů v kapalinách je obtížnější oproti zobrazování na vzduchu a velmi často jsou výsledné snímky také s horším rozlišením, jsou na obr. 45 a 46 srovnány dva skeny téhož pevného objektu, skenované v kapalině a na vzduchu.



Obr. 45: AFM sken kalibrační mřížky nasnímaný velkým skenerem pro suchá prostředí režimem C-AFM.



Obr. 46: *AFM sken kalibrační mřížky pořízený velkým skenerem pro kapalná prostředí. Sken byl pořízen v uhličitanovém pufru režimem C-AFM.* 

89





Obr. 47: Pro objektivní porovnání kvality povrchů je srovnáván řádkový profil skenu kalibrační mřížky v suchém (a) a kapalném (b) prostředí.

Při srovnání AFM snímků na obr. 45 a 46 je již zřejmé, že při zobrazování téhož pevného objektu (v našem případě kalibrační mřížky) je obraz pořízený v kapalině horší kvality ve srovnání se snímkem pořízeným v suchém prostředí.

Pro objektivní zhodnocení kvality zkoumaných povrchů je však nutné podívat se na řádkový profil skenu, s respektováním odlišného měřítka v ose *z*. Pokud bychom srovnali průběh křivek získaných z dat sesbíraných při skenu jednoho řádku, pak u kalibrační mřížky v suchém prostředí, obr. 47a, je zřetelně vidět pravidelně se opakující ostrý řádkový profil (téměř obdelníkové prohlubně). U skenu v kapalném prostředí, obr. 47b, je zřejmé, že hrot poskytuje nepravdivý řádkový profil, který již neodpovídá plně skutečnosti (pyramidální prohlubně). Tento jev byl vedle zobrazování v kapalném prostředí způsoben použitím staršího hrotu.

Protože je barevné škálování světlých a tmavých odstínů u jednotlivých skenů závislé na množství povrchových nerovností ve skenované oblasti, je nutno vždy se podívat na výškové měřítko uvedené u každého AFM snímku. Pokud bychom srovnali výškové hodnoty na obr. 45 a 46(lépe však z profilů na obr. 47 a 48), zjistíme, že se výškové hodnoty z v rámci téhož zobrazovaného objektu liší o stovky nm (hloubka zářezů na zobrazované mřížce je cca 245 nm pro sken v suchém prostředí, kolem 800 nm pro sken v kapalině). Tento jev je v tomto případě způsoben použitím odlišných skenerů, kdy velký skener pro kapalná prostředí již nutně vyžaduje kalibraci.

Při zobrazování v kapalinách je běžné, že jsou hrotem během skenování zachyceny nečistoty (obsažené v zobrazovacím roztoku, v našem případě pufrovém roztoku), které hrot při rastrování povrchu táhne sebou. Tyto nečistoty byly při našem zobrazování obsaženy v zobrazovací kapalině (uhličitanový pufr, deionizovaná voda o měrném odporu 0,1 µS.cm<sup>-1</sup>). Takto kvalitní voda byla použita také při oplachování použitého nádobí. Při úzkostlivém dodržování čistoty sice byl zaznamenán určitý pokles v množství nečistot zobrazených společně se zobrazovanými objekty v kapalném prostředí, přesto se však jejich efekt nepodařilo zcela eliminovat.

V důsledku nečistot obsažených v kapalinách bylo v našich experimentech výsledné rozlišení obrazu pořízeného v kapalině obecně horší, kontury zobrazovaných objektů nejasné (rozmazané) a snímek obvykle obsahoval větší množství světlých čar až pruhů (např. obr. 46, 51b, 57 nebo 58). Tyto čáry (až pruhy) jsou způsobeny zejména v důsledku vzrůstu adhezních sil mezi hrotem s nečistotou a zobrazovaným povrchem. Dalším velmi častým jevem při zobrazování v kapalinách bylo přerušení až ztráta

kontaktu mezi hrotem a skenovaným povrchem.

Na dalším AFM snímku je prezentována kvalita čerstvě odštípnutého slídového substrátu (obr. 48). Změřená hodnota RMS drsnosti povrchu z uvedeného skenu je 0,09 nm. Tento údaj je zcela srovnatelný s informacemi v odborné literatuře (např Ouerhi et al. 2002, RMS slídového povrchu zobrazeného na vzduchu 0,07 nm) a dokazuje, že slídové štěpy mají dostatečně hladký povrch, a proto jsou vhodné i pro zobrazení tak malých molekul, jako je plazmidová DNA.



Obr. 48: *AFM sken čerstvě odštípnuté, nemodifikované slídy. Měřeno režimem C-AFM, malým skenerem pro suchá prostředí.* RMS *slídy je* 0,09 nm.

## 6.1 AFM snímky slídy aktivované Mg<sup>2+</sup>

Na AFM snímcích na obr. 49 jsou prezentovány skeny slídy aktivované hořečnatými kationty (postup viz 5.1.1 Úprava substrátů). Povrch takto modifikované slídy sice vykazoval použitelné hodnoty RMS, (0,8±0,4) nm, k zobrazení plazmidové DNA, avšak na snímcích byly opět velmi často patrné efekty související zřejmě se znečištěním zobrazující kapaliny (nebo použitého nádobí). Jak již bylo řečeno dříve, při pečlivém dodržování čistoty byl zaznamenán pokles v množství nečistot zobrazených společně se zobrazovanými objekty v kapalném prostředí, přesto se však jejich efekt nepodařilo zcela eliminovat.

Na slídě modifikované Mg<sup>2+</sup> kationty nebyla Explorer AFM zobrazena plazmidová DNA (pRW 3822, stanoveno pro osm nezávislých vzorků).

Protože metoda úpravy slídy kationty byla při zobrazování DNA velmi populární a je v těchto aplikacích dosud používána (viz rešeršní část), předpokládám, že neúspěch při uchycení plazmidové DNA a jejím zobrazení přístrojem Explorer AFM nebyl způsoben neznámou chybou v metodice přípravy, ale nevhodným výběrem pufrového roztoku. V našich experimentech s Mg<sup>2+</sup> modifikovanou slídou byla použita plazmidová DNA rozpuštěná v uhličitanovém pufru o velmi vysokém pH (pH 9,0). Domnívám se, že hlavní příčina neúspěchu při zobrazení DNA byla volba tohoto pufrového roztoku, který negativně ovlivnil adsorpci plazmidové DNA na Mg<sup>2+</sup> modifikovaný substrát.

Jak bylo později zjištěno, tento typ pufrového roztoku je používán při zobrazování plazmidové DNA jen ojediněle a článek, který byl inspirací k výběru tohoto pufrového roztoku (Tatte et al. 2003) je jediným ze všech citací uvedených v této diplomové práci, který uhličitanový pufr používá.



Obr. 49: Skeny slídy aktivované hořečnatými kationty. Slída byla zobrazována v uhličitanovém pufru malým skenerem pro kapalná prostředí režimem C-AFM.

## 6.2 AFM snímky silanizované slídy

V této části diplomové práce jsou prezentovány AFM snímky slídového povrchu silanizovaného metodami "liquid APTES", "vapour APTES" a "neat APTES", postup přípravy viz 5.1.1 Úprava substrátů.

Na obr. 50, 51, 52 a 53 jsou snímky slídy silanizované metodou "liquid APTES" o různých koncentracích silanu v rozpouštědle (zobrazeno v uhličitanovém pufru). Srovnáváme-li kvalitu takto silanizovaných povrchů prostřednictvím RMS drsnosti povrchu, dojdeme ke shodě s odbornou literaturou (Sasou et al. 2003, Tatte et al. 2003), tj. RMS silanizovaných povrchů klesá s klesající koncentrací APTESu v rozpouštědle.

Pro 1% v/v koncentraci APTESu byla naměřena RMS v rozmezí (13,3±4,6) nm pro 0,1% v/v koncentraci byla naměřena RMS silanizovaných povrchů (2,6±1,8) nm, pro koncentraci 0,01% v/v byla naměřena RMS v rozmezí (0,9±0,5) nm a pro koncentraci 0,001% v/v byla naměřena RMS v rozmezí (0,8±0,4) nm (hodnoty byly stanoveny pro pět nezávislých naměřených vzorků).

Z uvedených výsledků je zřejmé, že problémem "liquid metody" je velká variabilita v kvalitě silanizovaných povrchů v rámci jedné koncentrace APTESu. Předpokládám, že tato různorodost je způsobena především nepřesným dodržením inkubace slídy (jedna minuta) v silanizačním roztoku, svou roli může hrát také střední kvalita použitého rozpouštědla (98% aceton p.a.), kvalita vody a způsob uskladnění silanizovaného povrchu do doby, než byl zobrazován.

K uchycení plazmidové DNA byly použity pouze povrchy silanizované metodou "liquid APTES" o koncentraci APTESu 0,1% a 0,01%.

V rámci AFM aplikace bylo ověřeno, že povrchy silanizované metodou "liquid APTES" lze úspěšně použít jako substrát k uchycení DNA, a to dokonce i pro zobrazení plazmidové DNA *in situ* (tj. bez předchozího vysušení vzorku, např. obr. 57, 58, 63 a 64).



Obr. 50: *AFM snímek slídového povrchu silanizovaného metodou "liquid APTES", varianta 1. Koncentrace APTESu v silanizačním roztoku byla 0,001% v/v, snímek byl zobrazen malým skenerem v uhličitanovém pufru při použití TP-AFM.* RMS snímku je 0,51 nm (*a*) a 0,39 nm (*b*).



Obr. 51: AFM snímky slídy silanizované metodou "liquid APTES", varianta 1. Koncentrace APTESového roztoku byla 0,01% v/v, snímek byl zobrazen malým skenerem v uhličitanovém pufru režimem TP-AFM. RMS silanizovaného povrchu má hodnotu 0,86 nm (a), 0,38 nm (b).



Obr. 52: *AFM snímky slídy silanizované metodou "liquid APTES", varianta 1. Koncentrace APTESového roztoku byla 0,1% v/v, snímek byl zobrazen malým skenerem v uhličitanovém pufru.* RMS *silanizovaného povrchu má hodnotu 1,26 nm (a) a 0,92 nm (b).* 



Obr. 53: AFM snímek slídy silanizované metodou "liquid APTES", varianta 1. Koncentrace APTESu v silanizačním roztoku byla 1% v/v, snímek byl zobrazen malým skenerem v uhličitanovém pufru. RMS silanizovaného povrchu má hodnotu 9,6 nm.

U povrchů silanizovaných metodou "**neat APTES**" bylo často zřejmé (okem nebo prostřednictvím kamery zabudované v AFM měřicím systému), že by při případném zobrazování značně výškově heterogenního povrchu byl s velkou pravděpodobností poškozen hrot. Proto byly slídové substráty silanizované metodou "neat APTES" před AFM skenováním opláchnuty acetonem (cca 10 ml), deionizovanou vodou (cca 10 ml) a uhličitanovým pufrem a jejich kvalita byla před AFM měřením opět kontrolována (prostřednictvím kamery, případně použitím světelného mikroskopu).

Přesto u metody "neat APTES" činila velká variabilita v drsnosti povrchu slídy silanizované koncentrovaným APTESem (RMS se u snímků pohybovala v rozsahu dvou řádů – jednotky až sto nm) tyto povrchy naprosto nevhodnými k zobrazování plazmidové DNA a povrchy silanizované metodou "neat APTES" nebyly použity k uchycení plazmidové DNA. Tento závěr se sice shoduje s nepsanou informací v odborné literatuře (neboť silanizace čistým roztokem silanu není a nebyla prakticky k uchycení DNA používána, viz rešeršní část), nicméně tato metoda modifikace slídového substrátu byla doporučena k uchycení DNA v Tatte et al. (2003).



Obr. 54: *AFM snímek slídového povrchu silanizovaného metodou "neat APTES". Snímek byl zobrazen malým skenerem v uhličitanovém pufru v TP-AFM po předchozím oplachování v acetonu, deionizované vodě a uhličitanovém pufru.* RMS tohoto snímku je 5,2 nm.

Silanizace metodou "**vapour APTES**", poskytovala poměrně hladké povrchy (obr. 55) s RMS v rozmezí (0,5±0,2) nm (stanoveno pro pět nezávislých vzorků), avšak vzhledem k poruše AFM přístroje již nebylo ověřeno uchycení DNA na takto silanizovaných površích. Dle informací publikovaných v odborné literatuře se domnívám, že slídový povrch silanizovaný metodou "vapour APTES" je možno bez problémů použít jako substrát k uchycení DNA, a to dokonce i pro zobrazování *in situ* (tj. bez předchozího vysušení vzorku). K inkubaci DNA bych však místo uhličitanového pufru doporučila použít např. HEPES nebo TRIS pufrový roztok, ve kterém je rozptýlena DNA a provedeno AFM zobrazování.

Tato metoda silanizace byla aplikována také na skleněný povrch (krycí sklíčka), avšak o vhodnosti tohoto substrátu k uchycení DNA nelze zatím rozhodnout z důvodu malého počtu experimetů (porucha AFM přístroje).

Na výřezu slídy silanizované metodou "vapour APTES" (obr. 56) je zřejmá pórovitá struktura silanizovaného filmu, což je ve shodě s literaturou citovanou v rešeršní části (Tang et al. 2000). Podobnou strukturu lze vidět také na obr. 51b.



Obr. 55: *AFM snímek slídy silanizované metodou "vapour APTES". Sken byl získán v režimu TP-AFM, skenerem pro suchá prostředí.* RMS 0,41 nm.



Obr. 56: Sken výřezu z předchozího AFM snímku slídy silanizované metodou "vapour APTES". Snímek byl získán v režimu TP-AFM, skenerem pro suchá prostředí. Na tomto snímku je v náznacích vidět pórovitá struktura silanizovaného povrchu.

# 7 Diskuze AFM snímků plazmidové DNA

Na obr. 57 je vidět typický AFM snímek oblasti s plazmidovou DNA. Takovéto AFM snímky byly získávány v počátcích měření této diplomové práce. Naskenovaná data na obr. 57 jsou pouze proložena plochou prvního řádu pro korekci zakřivení skenujícího piezomateriálu.

O tom, že uzavřené vláknité struktury na zmíněném skenu opravdu reprezentují plazmidovou DNA se můžeme přesvědčit například analýzou výškových dat sesbíraných v jednom řádku rastru. Z profilu řádků různě vybraných z nasnímaného obrazu (software umožňuje výběr z horizontálního, vertikálního či ručně vedeného proložení řádku) bylo ověřeno, že výška vláken se pohybuje zhruba kolem tří nanometrů. V tomto skenu jde však o velmi neostré výškové přechody a obraz je celkově velmi zašuměný, což může být způsobeno nekvalitně připraveným substrátem, tepelným driftem AFM měřicího zařízení, zejména však použitím staršího, otupeného hrotu. V dolní části snímku je navíc patrné, že hrotem byly zachyceny nečistoty, což výrazně zhoršilo kvalitu výsledného obrazu.

Abychom mohli kvalitně odečítat výškové hodnoty zobrazených objektů, je zapotřebí, aby sken vykazoval kvalitu obrázků srovnatelnou např. s obr. 58.



Obr. 57: AFM snímek oblasti s plazmidovou DNA. Silanizace slídy metodou "liquid APTES" (0,01% APTESu), zobrazováno TP-AFM v uhličitanovém pufru.

Na obr. 58 je již mnohem zřetelnější struktura převážně uzavřených molekul plazmidové DNA. Data prezentována na tomto snímku jsou opět proložena pouze plochou prvního řádu. Na skenu je zřetelné zachytávání nečistot hrotem a jejich táhnutí ve směru skenování (zejména pravý horní roh), v dolní části opět docházelo k přeskokům mezi hrotem a zobrazovaným povrchem.

Na následujících obrázcích (obr. 59) jsou prezentovány řádkové profily, ze kterých je již zcela zřejmé, že výškový profil plazmidů odpovídá teoretickým hodnotám (průměr DNA vlákna pro formu B je 2 nm, měřené hodnoty z profilu řádku jsou orámovány). Výška zobrazených molekul na tomto snímku byla stanovena na  $(2,1\pm0,2)$  nm (pro čtyři různé plazmidy, celkem 16 měřených hodnot), šířka vlákna DNA (29±5) nm byla stanovena v poloviční výšce. Oba tyto údaje velmi dobře korespondují s hodnotami prezentovanými v odborné literatuře (např. Hansma et al. 1993, DNA zobrazená ve vodném roztoku vykazovala výšku (2,5±0,5) nm a šířku měřenou v poloviční výšce (19±4) nm<sup>97</sup>).

<sup>&</sup>lt;sup>97</sup> Jak bylo řečeno dříve, rozlišení v rovině (x y) je dáno zejména poloměrem zakřivení hrotu  $R_c$ , a proto se domnívám, že stejně jako výška, tak i šířka molekuly DNA měřená z AFM snímků je zcela srovnatelná s údaji v odborné literatuře.



zachytávání nečistot (zřejmě slabě uchycených částí plazmidové DNA)

ztráta kontaktu mezi hrotem a zobrazovaným povrchem (celý světlý pruh)

Obr. 58: Na tomto AFM snímku jsou již zřetelné uzavřené struktury plazmidové DNA. Data na tomto snímku jsou pouze proložena plochou prvního řádu a proto jsou struktury jen lehce zřetelné. Po softwarové úpravě jsou však plazmidy DNA zřetelné (viz obr. 57 a 59).





Obr. 59: Ukázka výškových profilů řádků předchozího skenu.

Pro lepší vizuální přehled naskenované oblasti je možno softwarově zjemnit nerovnosti pozadí a zvýraznit naskenované struktury. Na obr. 60 a 62 jsou již velmi pěkně zřetelné uzavřené kruhové molekuly DNA. Tyto snímky jsou softwarově upraveny, jde však o tentýž sken jako na obr. 58. Tento reprezentující snímek byl získán inkubací plazmidové DNA na slídovém substrátu upraveném modifikací metodou "liquid APTES" koncentrace APTESu 0,1% (na modifikovaném neopláchnutém substrátu byla dvě hodiny ponechána DNA v uhličitanovém pufru a po opláchnutí (uhličitanovým pufrem) byl vzorek s DNA ihned zobrazován v tomtéž pufrovém roztoku).



Obr. 60: AFM snímek molekul plazmidové DNA zobrazených na povrchu slídy modifikované metodou "liquid APTES", varianta 1. Zobrazeno malým kapalným skenerem v uhličitanovém pufru režimem TP-AFM.



Obr. 61: Softwarově vytvořené různé výřezy z oblasti naskenované na obr. 60.

- a) 2D varianta
- b) 3D varianta

V orámovaných oblastech na obr. 61<sup>98</sup> jsou zvýrazněna místa, kde hrot zachytil část plazmidové DNA a dále ji táh s sebou při skenování. Při dalším kontaktu s vláknem DNA se hrot zřejmě od nečistoty oprostil. Na snímku se zvětšení hrotu o velikost nečistoty projevilo naskenováním plochy o stejné výšce mezi vlákny plazmidové molekuly (obr. 61b).

<sup>&</sup>lt;sup>98</sup> Je nutno upozornit na rozdíl, mezi softwarovým výřezem z již naskenovaného obrázku (např. obr. 61) a naskenovaným výřezem (tj. byla skenována menší oblast zkoumaného vzorku, např. obr. 66).



Obr. 62: Detailní pohled na výřez ze snímku na obr. 58. Na snímku je zřetelná kruhová struktura plazmidové molekuly.
Na následujícím snímku (obr. 63) je prezentován méně vydařený sken plazmidové DNA, kdy "pruhy" na AFM obrázku jsou opět způsobeny špatným kontaktem mezi hrotem a vzorkem. Jak bylo výše řečeno, může být ztráta kontaktu způsobena buď slabým uchycením vzorku, špatným nastavením parametrů skenování nebo obecně nestabilitou AFM měřicího přístroje. I z takto nekvalitních AFM snímků lze vyčíst výšku pozorovaných objektů a usoudit, zda opravdu jde o molekuly plazmidové DNA.2000 m



Obr. 63: *AFM sken plazmidové DNA režimem TP-AFM (a) a řádková analýza (b).* 

109

Domnívám se, že nestabilní interakce mezi hrotem a zobrazovaným vzorkem je u obr. 63 (stejně jako u obr. 64) způsobena především slabým uchycením zobrazované DNA. V obou případech byla plazmidová DNA byla inkubována 15 minut na slídě silanizované metodou "liquid APTES", varianta 1 a oba AFM snímky byly získány v uhličitanovém pufru režimem TP-AFM bez předchozího vysušení (opachovací krok byl vždy dodržen). Ve srovnání se snímkem na obr. 58 byl však k silanizaci použit APTES odlišného stáří.

U snímku na obr. 60 (resp. 58 až 62) byl použit APTES o stáří cca jeden týden. Tato frakce APTESu však nebyla od svého prvního otevření uchována v inertní atmosféře a proto předpokládám, že slabé uchycení DNA (obr. 63 a 64) bylo způsobeno právě nedokonalou silanizací slídového povrchu, v důsledku použití částečně zpolymerizovaného APTESu (staří cca 4 měsíce).

I přes nedokonalou silanizaci je na AFM snímku (obr. 64) zřetelná pórovitá struktura silanizovaného filmu a v levém dolním rohu (orámováno) je možno tušit strukturu plazmidové DNA. Jak bylo řečeno výše, jde pravděpodobně o velmi slabě uchycenou DNA, která svým pohybem během skenování výrazně zhoršila rozlišení získaného snímku.



Obr. 64: *AFM snímek slídy silanizované metodou "liquid APTES", varianta 1. 0,01% koncentrace APTESu, zobrazeno TP-AFM v uhličitanovém pufru.* 

Z dalších AFM experimentů vyplynulo, že nedokonalé uchycení DNA molekul bylo opravdu způsobeno polymerací zásobního roztoku APTESu. Po zakoupení nového silanizačního roztoku již byly snadno získány snímky plazmidové DNA uchycené na silanizovaném substrátu (DNA byla dispergována v HEPES-Mg nebo TRIS-HCl pufru). Při silanizačních procedurách byl však použit 98% aceton (tj. bez přidání vody). V těchto experimentech bylo dále ověřeno, že krok, při kterém je slída po silanizaci upravena inkubací na vzduchu při pokojové teplotě a inkubací při teplotě 90 °C, není nezbytný, stejně jako předchozí úprava slídy v roztoku NaOH (varianta 4).

Dále byly pro zjednodušení zobrazování vzorky po inkubaci (a opláchnutí deionizovanou vodou) vysušeny proudem argonu. Vlastní zobrazování proběhlo ve vzduchu režimem NC-AFM. Po ověření vhodnosti této metodiky k uchycení plazmidové DNA byla na těchto vzorcích dále zkoumána možnost uchování vzorků. Bylo ověřeno, že vzorky plazmidové DNA uchycené na silanizované slídě lze uchovat v argonové atmosféře cca 1 měsíc od přípravy bez zřetelného poškození (podobné závěry lze najít např. v Bezanilla et al. (1995)). AFM snímky uvedené na obr. 69 až 71 byly uchovány v exsikátoru plněném argonem cca 4 týdny od své přípravy a poté zobrazeny NC-AFM.

Na obr. 65 až 71 je ukázka a analýza vybraných AFM snímků připravených metodou "liquid APTES", varianta 4. Pro lepší přehlednost je zobrazená DNA orámována.



Obr. 65: *AFM snímek plazmidové DNA uchycené na slídě silanizované metodou "liquid APTES", varianta 4. Zobrazeno na vzduchu režimem NC-AFM.* 



Obr. 66: *AFM snímek plazmidové DNA, naskenovaný výřez z oblasti naskenované na obr.* 65.

- a) Topografický 2D snímek získaný při přímém posunu AFM sondy po rastru
- b) Topografický 2D snímek získaný při zpětném posunu AFM sondy po rastru



Obr. 67: 3D snímek plazmidové DNA, softwarová úprava předchozího skenu

K určení výšky a šířky vlákna měřeného AFM hrotem byla použita opět řádková analýza, kdy byla vyhodnocena výška DNA naměřená z tohoto snímku 0,9±0,2 nm a šířka stanovená v poloviční výšce (22±4) nm (data byla vyhodnocena z profilu 15 řádkových proložení).

Obdobné výškové hodnoty pro DNA lze najít např. v práci Schaper et al. (1994), (0,83–0,90) nm pro výšku molekuly DNA, zobrazováno na vzduchu.



Obr. 68: Obrazová analýza AFM snímku plazmidové DNA (obr. 66). Výška DNA naměřená z tohoto snímku je  $(0,9\pm0,2)$  nm, šířka stanovená v poloviční výšce $(22\pm4)$  nm (data byla vyhodnocena z profilu 15 řádkových proložení).



Obr. 69: AFM snímek plazmidové DNA uchycené na slídě silanizované metodou "liquid APTES", varianta 4. Zobrazeno na vzduchu režimem NC-AFM.



Obr. 70: 3D projekce naskenovaného výřezu z oblasti, uvedené na předchozím obrázku.



Obr. 71: Obrazová analýza AFM snímku plazmidové DNA zobrazené na obr. 70. Výška DNA naměřená z tohoto snímku je  $(0,8\pm0,1)$  nm, šířka stanovená v poloviční výšce  $(21\pm6)$  nm (data byla vyhodnocena z profilu 15 řádkových proložení).

## 8 Diskuze AFM snímků thylakoidů

Oddělení biofyziky na PřF UP se zaměřuje na studium fotosyntézy, proto jsem se v rámci biologických aplikací pokusila zobrazit také thylakoidní membrány.

Thylakoidní membrána se vyskytuje v chloroplastech (viz obr. 72) a odehrává se v ní světelná fáze fotosyntézy. Dochází zde k přeměně světelné energie na energii chemickou ve formě ATP, která je dále využitelná v metabolických procesech..



Obr. 72: Struktura chloroplastu.

Při přípravě vzorků thylakoidních membrán byl zásobní roztok thylakoidů rozředěn resuspendačním pufrem na pracovní roztoky o koncentraci chlorofylu 5,11 µg/ml, 0,51 µg/ml a 0,05 µg/ml a kapka cca 20 µl pracovního roztoku byla napipetována na čerstvě odštípnutý slídový substrát. Po vysušení slabým proudem argonu byly vzorky AFM zobrazovány režimem TP-AFM na vzduchu.

Z obrázků 73 až 75 je zřejmé, že vhodná pracovní koncentrace chlorofylu je 0,05 µg/ml, kdy na AFM snímcích o rozměru 2µm x 2µm bylo zobrazeno jen jeden či dva thylakoidy. Pro vyšší koncentraci (0,51 µg/ml) je na AFM snímcích patrné vrstvení thylakoidů. Pro koncentraci chlorofylu 5,11 µg/ml již nebyly AFM snímky měřeny.





Obr. 73: AFM snímky thylakoidní membrány, zobrazeno TP-AFM ve vzduchu. Koncentrace chlorofylu  $0,05 \ \mu g/ml$  (a)  $0,51 \ \mu g/ml$  (b).



Obr. 74: 3D AFM snímek thylakoidní membrány, skenováno na vzduchu TP-AFM. Koncentrace chlorofylu 0,05 µg/ml (a) 0,51 µg/ml (b).



Obr. 75: 3D AFM snímek thylakoidní membrány, skenováno na vzduchu TP-AFM. Koncentrace chlorofylu 0,05 µg/ml (a) 0,51 µg/ml (b).

## 9 <u>Závěr</u>

Po zpracování problematiky zobrazování biologických vzorků metodou AFM byla jako vhodný biologický objekt k AFM zobrazování vybrána plazmidová DNA. Důvodem preference plazmidové DNA (pRW 3822) je znalost parametrů, jasně definujících zobrazovaný předmět. Z parametrů je to výška vlákna (daná průměrem konkrétní konformace DNA), jeho délka, případně i šířka (šířka vlákna měřeného v poloviční výšce je dána konvolucí tvaru hrotu a zobrazovaného předmětu, proto při srovnání s výsledky v odborné literatuře byl brán v potaz typ hrotu). Svou roli při výběru vhodného biologického vzorku hrál také fakt, že právě DNA byla vůbec první biologický objekt zobrazený metodou AFM.

V rámci vhodných metodik k uchycení DNA ke slídovému substrátu byla vybrána metoda aktivace slídy kationty a metoda silanizace 3aminopropyltriethoxysilanem.

- Při použití metody "drop evaporation" nebyla na AFM snímcích zobrazena DNA adsorbovaná z HEPES-Mg pufrového roztoku na čistou, nemodifikovanou slídu. Tento závěr byl však stanoven pouze ze dvou experimentů (porucha AFM přístroje). Dle údajů v oborné literatuře se domnívám, že DNA adsorbovaná z těchto pufrových roztoků by měla být metodou "drop evaporation" dostatečně uchycena na nemodifikovaném slídovém povrchu a následně AFM zobrazena (Bezanilla et al. 1995). To, že plazmidová DNA (v HEPES-Mg pufrovém roztoku) nebyla zatím zobrazena přístrojem Explorer AFM může být způsobeno nadměrným opláchnutím adsorbovaných substrátů během přípravy vzorku, nebo nevhodnou inkubační dobou (během inkubace převládla desorpce). V případě plazmidové DNA dispergované v uhličitanovém pufru se domnívám, že byl neúspěch zapříčiněn špatnou volbou pufrového roztoku (uhličitanový pufr neobsahuje vhodné multivalentní kationty a má vysoké pH, stanoveno pro osm nezávislých vzorků).
- Při aktivaci slídy hořečnatými kationty nebyla na AFM snímcích pozorována uchycená DNA, což bylo zřejmě způsobeno nevhodným výběrem pufrového roztoku o vysokém pH (uhličitanový pufr, pH 9,0, stanoveno pro osm nezávislých vzorků).
- V rámci metod silanizace se jako vyhovující jeví metoda "liquid APTES" a metoda "vapour APTES". U metody "neat APTES" nebyly potvrzeny vhodné parametry

silanizované slídy (RMS se u snímků pohybovala v rozsahu dvou řádů (cca 5 až 100 nm), a proto takto modifikovaná slída nebyla dále použita k uchycení DNA.

- U metody "vapour APTES" byla vyhodnocena RMS silanizovaných slídových substrátů v rozmezí (0,5±0,2) nm (stanoveno pro pět nezávislých vzorků). Tento údaj velmi dobře odpovídá údajům v odborné literatuře (např. Lyubchenko et al. 2003, RMS silanizovaného povrchu metodou "vapour APTES" (0,31±0,06) nm). Bohužel vhodnost takto připravených povrchů pro uchycení DNA již nebyla z důvodu poruchy AFM měřicího přístroje stanovena
- U metody "liquid APTES" byly nejprve srovnávány povrchy silanizované v roztocích o různé koncentraci APTESu v rozpouštědle. Při srovnání kvality takto silanizovaných povrchů prostřednictvím RMS drsnosti povrchu bylo zjištěno, že RMS silanizovaných povrchů klesá s klesající koncentrací APTESu v rozpouštědle, což je ve shodě s odbornou literaturou (např. Sasou et al. 2003, Tatte et al. 2003). Pro 1% v/v koncentraci APTESu byla naměřena RMS v rozmezí (13,3±4,6) nm pro 0,1% v/v koncentraci byla naměřena RMS silanizovaných povrchů (2,6±1,8) nm, pro koncentraci 0,01% v/v byla naměřena RMS v rozmezí (0,9±0,5) nm a pro koncentraci 0,001% v/v byla naměřena RMS v rozmezí (0,8±0,4) nm (hodnoty byly stanoveny vždy pro pět nezávislých vzorků).
- K uchycení plazmidové DNA byly otestovány povrchy silanizované metodou "liquid APTES", o koncentraci APTESu 0,1% a 0,01%. Bylo ověřeno, že takto připravené povrchy lze úspěšně použít jako substrát k uchycení DNA, a to dokonce i pro zobrazení plazmidové DNA *in situ* (tj. bez předchozího vysušení vzorku). V rámci jednotlivých metod bylo vyzkoušeno několik variant a bylo ověřeno, že předchozí upravení slídy inkubací v roztoku NaOH, stejně jako doupravení slídy inkubací na vzduchu při pokojové teplotě (12 h) a při 90 °C (12 h) není nezbytným krokem při přípravě silanizovaných substrátů.
- Při zobrazení plazmidové DNA (pRW 3288) bylo zároveň ověřeno, že Explorer AFM je vhodný pro zobrazování plazmidové DNA, a to jak v suchém prostředí tak v kapalině.
- Z analýzy AFM snímků plazmidové DNA vyplynulo, že při zobrazení v kapalině (uhličitanový pufr) je měřená výška vlákna DNA (2,1±0,2) nm (stanoveno pro čtyři různé plazmidy, celkem 12 měřených hodnot), zatímco šířka měřená v poloviční výšce vykazovala hodnoty (29±5) nm. Při zobrazování na vzduchu byla pozorována

redukovaná výška DNA, (0,9±0,2) nm, šířka měřená v poloviční výšce (21±6) nm. Tyto údaje jsou zcela v souladu s citovanou literaturou (např. Yang et al. 1993, Schaper et al. 1994, Lyubchenko et al. 1997a).

Při dalším studiu plazmidové DNA přístrojem Explorer AFM by mohly být AFM experimenty zaměřeny na srovnání úspěšnosti adsorpce plazmidové DNA na povrchy silanizované metodou "liquid APTES" a metodou "vapour APTES". Dále bych navrhla srovnat míru adsorpce DNA na silanizované substráty pro DNA rozpuštěnou v různých pufrových roztocích.

Po zakoupení vhodného přídavného software by mohla být také měřena délka zobrazovaných plazmidů a při zobrazení v kapalině a ve vzduchu by mohla být porovnána délka plazmidové DNA v konformaci B (tj. zobrazováno v kapalině) a délka téže plazmidové DNA v konformaci A (tj. zobrazeno po vysušení na vzduchu).

Explorer AFM bych však nedoporučila k pozorování dynamických jevů zkoumaných v souvislosti s DNA (např. posun enzymu po vlákně DNA), neboť při opakovaném skenování stejné oblasti (minuty) byl na AFM snímcích velmi výrazný posun skenovaného místa.

V rámci biologických aplikací Explorer AFM zkoumaných v této diplomové práci byly zobrazeny také thylakoidy. Vzorky thylakoidů byly připraveny metodou "drop evaporation", kdy suspenze thylakoidních membrán o vhodné koncentraci byla napipetována na čerstvý slídový substrát a osušena proudem argonu. Vhodná koncentrace chlorofylu v naneseném roztoku pro přípravu AFM vzorků byla 0,05 µg/ml.

Při zobrazování thylakoidní membrány bych navrhla vyzkoušet zobrazení thylakoidů v kapalině a posléze přejít na zobrazení *in situ* (tj. bez předchozího vysušení). U takto připravených vzorků zobrazovaných v kapalině by mohla být metodou AFM vizualizována např. změna velikosti zobrazovaného thylakoidu pod vlivem narůstající iontové síly zobrazujícího roztoku.

## 10 Seznam použité literatury

Abdelhady H.G.; Allen S.; Davies M.C.; Roberts C. J.; Tendler, S.J.B.; Williams P.W., Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I, Nucleic Acid Research (2003), vol. 31(14), pg. 4001–4005.

Allen J.M.; Dong X.F.; O'Neil T.E.; Yau P.; Kowalczykowski S.C.; Gatewood J., Balhorn R.; Bradbury E.M., Atomic force microscope measurements of nucleosome cores assembled along defined DNA sequences, Biochemistry, 1993, vol 32, pg. 8390-8396.

Bahatyrova S.; Frese R.N.; Siebert C.A; Olsen J.D.; Werg K.O.; Grondelle R.; Niederman R.A; Bullough P.A.; Otto C.; Hunter C.N.; The native architecture of photosynthetic membrane, Nature, 2004, vol.430.

Baumann C.G.; BloomfieldV.A.; Smith S.B.; Bustamante C.; Wang M.D., Stratching of Single Collapsed DNA Molecules, Biophysical Journal, 2000, vol. 78, pg. 1965-1978.

Berquand A.; Mingeot-Leclercq M.-P.; Dufrene Y.F., Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy, Biochemica et Biophysica acta, 2004, vol. 1664, pg. 198-205.

Bezanilla M.; Manne S.; Laney D.E.; Lyubchenko Y.L.; Hansma H.G., Adsorption of DNA to Mica, Silylated Mica and Minerals: Characterization by Atomic Force Microscopy, Langmuir, 1995, vol 11, pg. 655-659.

Bolshakova A.V.; Kiselyova O.I.; Filonov A.S.; Frolova O.Y.; Lyubchenko Y.L.; Yaminsky I.V., Comparative Studies of Bacteria with an Atomic Force Microscopy Operating in Different Modes, Ultramicroscopy, 2001, vol. 86, pg. 121-128.

Bustamante C.; Vesenka J.; Tang C.L.; Rees W.; Guthold M.; Keller R., Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy, Biochemistry, 1992, vol. 31, pg. 22-26

Bustamante, C.; Rivetti, C., Visualizing Protein-Nucleic Acid Interactions on a Large Scale with the Scanning Force Microscope, Annu. Rev. Biophys. Biomol.Struct., 1996, vol. 25. pg. 395-429

Bustamante, C; Zuccheri,G.; Leuba, S.H.; Yang,G.; Samoris,B., Visualization and analysis of chromatin by scanning force microscopy, Methods: A companion to methods in Enzymology, 1997a, vol. 12, pg. 73-83.

Bustamante C.; Rivetti C.; Keller D.; Scanning Force Microscopy Under Aqueous Solutions, Current Opinion in Structural Biology, 1997b, vol. 7, pg. 709-714.

Bustamante C.; Smith S.; Liphardt J.; Smith D., Single-molecule studies of DNA mechanics, Current Opinion in Structural Biology, 2000, vol. 10, pg. 279-285

Costa L.; Pinto J.;De Souza G.G.B.; Sorenson M.M.; Bisch S.M.;Weismuller G., Chemical treatement of mica for atomic force microscopy can affect biological sample conformation, Biophysical Chemistry, 2004, vol. 109, pg. 63-71

Czajkowsky D.M., Shao Z, Submolecular resolution of single macromolecules with atomic force microscopy, FEBS Letters, 1998, vol. 430, pg. 51-54

Dahlgren P.R.; Lyubchenko L.Y., Atomic Force Microscopy Study of the Effects of Mg2+ and Other Divalent Cations on the end to end DNA Interactions, Biochemistry, 2002, vol. 41, pg. 11372-11378

Dame, R.T.; Wyman, C.; Goosen, N., H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy, Ultramicroscopy, 2000, vol. 28, pg. 3504-3510

De Souza Pereira, R., Atomic Force Microscopy as a Novel Pharmacological Tool, Biochemical Pharmacology, 2001, vol. 62, pg. 975-983

Deleu M; Nott K; Brasseur R; Jacques P.; Thonart P.; Dufrene Y.F., Imaging Mixed Lipid Monolayers by Dynamic Atomic Force Microscopy, Biochimica et Biophysica Acta, 2001, vol. 1513,pg. 55-62

Dietz P.; Hansma P.K.; Inacker O., Lehmann H.D.; Herrman K.H., Surface pore structures of micro- und ultrafiltration membranes imaged with the atomic force microscope, Journal of Membrane Science, 1992, vol. 65, pg. 101-111

Doktycz, M.J.; Sullivan, C.J.; Hoyt, P.R.; Pelletier, D.A.; Wu,S.; Allison, D:P., AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces, Ultramicroscopy, 2003, vol. 97, pg. 209-216

Dufrene, Y.F., Recent Progress in the Application fo Atomic Force Microscopy Imaging and Force Specroscopy to Microbiology, Current Opinion in Microbiology, 2003, vol. 6, pg. 317-323

Dvorak JA, Kobayashi S, Abe K, Fujiwara T, Takeuchi T, Nagao E, The application of the atomic force microscope to studies of medically important protozoan parasites, Journal of Electron Microscopy, 2000, 49 (3): pg. 429-435

Dvorak, J.A., The application of atomic force microscopy to the study of living vertebrate cells in culture, Methods, 2003, vol. 29, pg. 86-96

Fang, Y.; Hoh, J.H., Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations, Nucleic Acid Research, 1998, vol. 26, pg 588-593

Fang, Y.; Hoh, J.H., Cationic silanes stabilize intermediates in DNA condensation, FEBS Letters, 1999, vol. 459, pg. 173-176

Feng, X.Z.; Bash, R.; Balagurumoorthy, P.; Lohr, D.; Harrington, R.E.; Lindsay, S.M., Conformational transition in DNA on a cold surface, Nucleic Acids Research, 2000, vol. 28, pg. 593-596

Fritz,J.; Anselmetti,D.;Probing Single Biomolecules with Atomic Force Microscopy, Journal of Structural Biology, 1997, vol. 119, pg. 165-171

Fritz,J:; Baller,M.K.; Lang,H.P.; Rothuizen,H.; Vettiger,P.; Meyer,E.; Guntherodt, 'H-J.; Gerber, Ch,Gimzewski,J.K., Translating Biomolecular Recognition Into Nanomechanics, Science, 2000, vol. 288, pg. 316-322

Garcia, R.; Perez, R., Dynamic atomic force microscopy methods, Surface science reports, 2002, vol. 47, pg.197-301

Goldmann, M.; Davidovits, J.V.; Silberzan, P., Kinetics of self-assembled silane monolayers at

varions temperature evidence of 2D foam, Thin Solid Films, 1998, pg.166-171

Hansen,K.M.; Metha,A.; Hansen,K.M.; Thundat,T.G.; Stability of Thiol-immobilized DNA on Microcantilever Sensors, 2004

Hansma,H.G.; Vesenka, J.; Siegerist, G.; Kelderman, G.; Morret, H.; Sinsheimer, R.L.; Elings, V.; Bustamante, C.; Hansma, P.K., Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope, Science, 1992, vol. 256

Hansma,H.G.; Bezanilla,M.; Zenhausern,F.; Adrian,M.; Sinsheimer,R.L., Atomic Force Microscopy of DNA in Aqueous Solutions, Nucleic Acid Research, 1993, vol. 21, pg. 505-512

Hansma, P.K.; Cleveland, J.P.; Radmacher, M.; Walters, D.A.; Hillner, P.E.; Bezanilla, M.; Fritz, M.; Vie,D.; Hansma, H.G., Tapping Mode Atomic Force Microscopy in liquids, Applied Physics Letters, 1994, vol 64

Hansma,H.G.; Laney,D.E.; Bezanilla,M:; Sinsheimer,R.L., Applications for Atomic Force Microscopy of DNA, Biophysical Journal, 1995, vol. 68, pg. 1672-1677

Hansma, H.G.; Revenko, I.; Kim, K.; Laney, D. E., Atomic Force Microscopy of Long and Short Double-Stranded, Single-Stranded and Triple-Stranded Nucleic Acids, Nucleic Acid Research, 1996, vol. 24, pg. 713-720

Hansma,H.G.; Kim,J.K.; Laney,D.E., Properites of Biomolecules Measured from Atomic Force Microscope Images: A Review, Journal of Structural Biology, 1997, vol. 119, pg. 99-108

Hansma,H.G.; Pietrasanta,L., Atomic Force Microscopy and Other Scanning Probe Microscopies, Current Opinion in Chemical Biology, 1998, vol. 2, pg. 576-584

Hansma,H.G., Surface Biology of DNA by Atomic Force Microscopy, Annual review of physical chemistry , 2001, 52/71-92.

Hansma,H.G.; Kasuya,K.; Oroudjev,E., Atomic Force Microscopy Imaging and Pulling of Nucleic Acids, Current Opinion in Structural Biology, 2004, vol. 14, pg. 380-385

Hegner, M.; Wagner, P.; Semenza, Immobilizing DNA on gold via thiol modification for atomic force microscopy imaging in buffer solution, FEBS Letters, 1993, vol. 3, pg. 452-456

Henderson, E., Imaging of Living Cells by Atomic Force Microscopy, Progress in Surface Science, 1994, vol. 46, pg.39-60

Hoh, J; Hansma, P.K., Atomic force microscopy for high-resolution imaging in cell biology, Trends in cell biology, 1992, vol. 2,

Hu,J.; Wang,M.; Weier,G. H.-U.; Frantz,P.; Ogletree,D.F.; Salmeron,M., Imaging of Single Extended Dna Molecules on Flat (Aminopropy)Triethoxysilane - mica by Atomic Force Microscopy, Langmuir, 1996, volume12, number 7

Ikai, A., Invited Review, Nano-mechanics of proteins with possible applications, Superlattices and Microstructures, 2002, vol. 31,

Jalili,N.; Layminarayna,K; A Review of Atomic Force Microscopy Imaging Systems: Application to Molecular Metrology and Biological Sciences, Mechatronics, 2004, vol. 14, pg. 907-954

Kaasgaard,T.; Mouritsen,O.G.; Jorgensen,K., Lipid domain formation and ligand-receptor distribution in lipid bilayer membranes investigated by atomic force microscopy, FEBS Letters, 2002, vol. 515, pg. 29-34

Kaftan,D.; Brumfeld,V.; Nevo,R.; Scherz,A.; Reich,Z., From chloroplasts to photosystems: in situ scanning force microscopy on intact thylakoid membrane, The EMBO Journal, 2002, vol. No. 21, pg. 6146-6153

Karrasch,S.; Dolder,M.; Schabert,F.; Ramsden,J.; Engel,A., Covalent Binding of Biological Samples to Solid Support for Scanning Probe Microscopy in Buffer Solution, Biophysical Journal, 1993, vol. 65, pg. 2437-2446

Kim,S.; Christenson,H.K.; Curry,J.E., The Efflect of Humidity on the Stability of an Octadecyltrethoxysilane Monolayer Self-Assembled on Untreated and Plasma-Treated Mica, Langmuir, 2002, vol. 18, pg. 2125-2129

Kuznetsov, YG, Malkin AJ, Lucas RW, Plomp M, McPherson A, Imaging viruses by atomic force microscopy, Journal of General Virology, 2001a

Kuznetsov,Y.G.; Datta,S.; Kothari,N.H.; Greenwood,A.; Fan,H.; McPherson,A., Atomic force microscopy investigation of fibroblasts infected with wild-type and mutant murine leukemia virus

Biphysical Journal, 2002, vol. 83, pg. 3665-3674

Lawrence, JC, Saslowsky, DE, Edwarson, JM, Henderson, RM, Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behaviof using atomic force microscopy, Biphysical Journal, 2003, vol. 84, pg. 1827-1832

Lee, G.U.; Chrisey, L.A.; Colton,R.J., Direct Measurement of the Forces between Complementary Strands of DNA, Science, 1994, vol. 4

Lehenkari PP, Charras GT, Nykanen A, Horton MA, Adapting atomic force microscopy from cell biology, Ultramicroscopy, 2000, vol. 82. Pg. 289-295

Lekka,M.; Gryboś,J.; Lekki,J.; Stachura,Z.; Styczen'J., Single-Bond Force Measured by Neans of Scanning Force Microscopy, Acta physica polonica, 2002, vol.102

Letho,T.; Miaczynska,M.; Zerial.M.; Müller,D.J.; Severin,F., Observing the Growth of Individual Actin Filaments in Cell Extracts by time-lapse Atomic Force Microscopy, FEBS Letters, 2003, vol. 551, pg. 25-28

Li Q.-M., Hansma H.G., Vesenka J., Kelderman G, Hansma P.K., Atomic force microscopy of uncoated plasmid DNA: nanometer resolution with only nanogram amounts of sample, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1992, vol.10,

Ling, L.; Butt, H-J.; Berger, R., Rupture force between the third strand and the double strand within a triplex DNA, Journal of American Chemistry Society, 2004,

Lyubchenko,Y.L.; Jacobs,B.L.; Lindsay,M.S., Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurements, Nucleic Acid Research, 1992a, vol. 20, no 15, pg. 3983-3986

Lyubchenko, Y.L.; Gall, A:A:; Shlyakhtenko, S.L.; Harrington, R:E.; Jacobs, B.L.; Oden, P.I.;

Linds,S.M., Atomic Force microscopy Imaging of Double Stranded DNA and RNA, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1992b, vol.10., no.3

Lyubchenko,Y:L.; Schlyaktenko,L.; Harrington,R.; Oden,P.; Lindsay,S., Atomic Force Microscopy of Long DNA: Imaging in Air and Under Water, Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, vol. 90, pg. 2137-2140

Lyubchenko, Y.L.; Shlyakhtenko, L.S., Visualization of Supercoiled DNA with Atomic Force Microscopy in Situ, Proc. Natl. Acad. Sci, 1997a, vol. 94, pg. 496-501

Lyubchenko,L.Y.; DNA Structure and Dynamics, Cell Biochemistry and Biophysics, 2004, vol. 41

Maeda,Y.; Matsumoto,T.; Kawai,T., Observation of Single and Double Stranded Dna using non-contact atomic force microscopy, Applied Surface Science, 1999, vol. 140, pg. 400-405

Martín,S.; Cea,P.; Lafuente,C.; Royo,F.M.; Lopez,M.C.; Hybrid Langmuir and Langmuir-Blodgett Films of a Viologen Derivate and TCNQ in a Mixed Valence State: Preparation route and characterization, Surface Science, 2004, vol. 563, pg. 27-40

Masens C; Schulte J; Philips M; Dligatch S, Ultra flat gold surfaces for use in chemical force microscopy: Scanning probe microscopy studies of the effect of preparation regime on surface morphology, Microscopy and Microanalysis, 2000, vol. 6, pg. 113-120

Medalia,O.; Englander,J.; Guckenberg,R.; Sperling.J.; AFM Imaging in Solution of Protein-DNA Complexes Formed on DNA Anchored to a Gold Surface, Ultramicroscopy, 2002, vol. 90, pg. 103-112

Mendez-Vias,A.; Corbacho,I.; Gondalez-Martin,M.L.; Neuvo,M.J., Direct Surface Probing of Cell Wall-Defective mutants of Saccharomyces cerevisiae by Atomic Force Microscopy, Applied Surface Science, 2004, vol. 238, pg. 51-63

Möller, R.; Csáki, A.; Kohler, J.M.; Fritzsche, W., DNA probes on chip surfaces studied by scanning force microscopy using specific binding of colloidal gold, Nucleic Acid Research, 2000,

Vol. 28, no. 20

Möller,C.; Allen,M.; Elings,V.; Engel,A:; Muller,D.J., Tapping Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces, Biophysical Journal, 1999, vol. 77, pg. 1150-1158

Moloney, M.; McDonnell, L.; O'Shea, H., Atomic Force Microscopy of BHK-21 Ccells: An Investigation of Cell Fixation Techniques, Ultramicroscopy, 2004, vol. 100, pg. 153-161

Morii, T.; Mizuno, R.; Haruta, H.; Okada, T., An AFM Study of the Elasticity of DNA Molecules, Thin Solid Films, 2004, vol. 464, pg. 456-458

Mou, J.; Czajkowcky, D.M.; Zhang, Y.; Shao, Z., High-resiolution Atomic Force Microscopy of DNA: the Pitch of the Double Helix, FEBS Letters, 1995, vol. 371, pg. 279-282

Murakami,M.; Hirokawa,H.; Hayata,I., Analysis of Radiation Damage of DNA by Atomic Force Microscopy in Comparison with Agarose Gel Electrophoresis Studies, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2000, vol. 44, pg. 31-40

Murakami, M.; Minamihisamatsu, M.; Sato, K.; Nayata, I., Structural Analysis of Heavy Iron

Radiation Induced Chromosome Aberrations by Atomic Force Microscopy, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001, vol. 48, pg. 293-301,

Nagami,F.; Zuccheri,G.; Samori,B.; Kuroda,R., Time-lapse Imaging of Conformational Changes in Supercoiled DNA by Scanning Force Microscopy, Analytical Biochemistry, 2002, vol. 300, pg. 170-176

Nagao, E.; Dvorak, J.A., An integrated approach to the study of living cells by atomic force microscopy, Journal of Microscopy, 1998, vol. 191, pg. 8-19

Nony, L.; Boisgard,R.; Aimé,J.-P., DNA properties investigated by dynamic force microscopy, Biomacromolecules, 2001, vol. 2, pg. 827-835

Noques,C.; Wanunu,M, A Rapid Approach to Reproducible, Atomically Flat Gold Films on Mica, Surface Science, 2004

Ouerghi,O.; Touhami,A.; Othmane,A, Investigation antibody-antigen binding with atomic force microscopy, Sensors and Actuators B, 84/167-175

Otsuka,I. Masashi Yaoita, Michi Higano,Seiiichi Nagashima and Ryoichi Kataoka, Tapping mode AFM study on the surface dynamics of a single glucose oxidase molecule on a Au $(1\ 1\ 1)$  surface in water with implication for a surface-induced unfolding pathway, Applied Surface Science, 2004, vol. 235, pg. 188-196

Pastre, D.; Pietrement, O.; Fusil,S.; Landousy J.; David,O.M.; Hamon,L.; Cam,L.E.; Zozime,A., Adsorption of DNA to Mica Mediated by divalent Counterions: A theoretical and Experimental Study, Biophysical Journal, 2003, 2507-2518

Pignataro,B:; Sardone,L.; Marletta,G., From Micr- to Nanometric Scale Patterning by Langmuir-Blodgett Technique, Materials Science and Engineering, 2002, vol. 22, pg. 177-181

Reiner,C.K.; Stroh,C.M.; Ebner,A.; Klampfl,C.; Gall,A.A.; Romanin,C.; Lyubchenko,L.; Hinterdorfer,P.; Gruber,H.J., Simple test systém for single moecule recognition force microscopy, Analytica Chimica Acta, 2003, vol. 479, pg. 59-75

Richert,L.; Arntz,Y.; Schaaf,P.; Voegel,J-C, Picart,C., pH Dependent Growth of poly(L-lysine)/poly(L-glutamic) acid multilayer films and their cell adhesion properties, Surface Science, 2004, vol. 570, pg. 13-29

Rivetti,C.; Codeluppi,S., Accurate Length Determination of DNA Molecules Visualized by Atomic Force Microscopy: Evidence for a Partial B- to A-form Transition on Mica, Ultramicroscopy, 2001, vol. 87, pg. 55-66

Rivetti,C.; Guthold,M.; Bustamante, C., Scanning force microscopy of DNA deposited onto Mica:equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis, Journal of Molecular Biology, 1996, vol. 264, vol. 919-932

Rugar, D.; Hansma, P., Atomic force microscopy, Physics Today, 1990, 23-30,

Saal,K.; Tatte,T.; Kurg,A.; Lohmus,R.; Maeorg,U.; Rinken,A.; Lohmus,A., Homogenous and Smooth Siloxane Films for AFM visualization of Immobilized Biomolecules, 2002

Sanchez-Sevilla, A.; Thimonier, J.; Marielley, M.; Roccca-Serra, J.; Barbet, J., Accuracy of AFM Measurements of the Contour length of DNA Fragments Adsorbed on Mica in Air and in

Aqueous Buffer, Ultramicroscopy, 2002, vol. 92, pg. 151-158

Santos, N.C.; Castanho, M.A.R.B., An Overview of the Biophysical Applications of Atomic Force Microscopy, Biophysical Chemistry, 2004, vol. 107, pg. 133-149

Sasou, M.; Sugiyama, S.; Yoshino, T.; Ohtani, T, Molecular Flat Mica Surface Silanized with Methyltrimethoxysilane for Fixing and Straightenig DNA, Langmuir, 2003, vol. 19, pg. 9845-9849

Shao, Z.; Mou,J.; Czajkowsky,D.M.; Yang,J.; Yuan,J., Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed, Advances in Physics, 1996, vol. 45, no1, pg. 1-86

Shlyakhtenko,S.L.; Potaman, V:N.; Sinden,R.R.; Lyubchenko,Y:L., Structure and Dynamics of Supercoil-Stabilized DNA Cruciforms, JMB Journal of molecular biology, 1998, vol. 280, pg. 61-72

Shlyakhtenko,L.S.; Gall,A.A.; Weimer,J.J.; Hawn,D:D.; Lyubchenko,Y.L., Atomic Force Microscopy Imaging of DNA Covalently Immobilized on a Functionalized Mica Substrate, Biophysical Journal, 1999, vol. 77, pg. 568-576

Shlyakhtenko,L.S.; Gall,A.A.; Filonov,A.; Cerovac,Z.; Lushnikov,A.; Lyubchenko,Y.L., Silatrane-based Surface Chemistry for Immobilization of DNA protein-DNA complexes and other biological materials, Ultramicroscopy, 2003a, vol. 97, pg. 279-287

Shlyakhtenko.L.S.; Miloseska,L.; Potman,V.N.; Sinden,R.R.; Lyubchenko.Y.L., Intersegmental Interactions in Supercoiled DNA: Atomic Force Study, Ultramicroscopy, 2003b, 97/263-270

Schaper, A.; Pietrasanta, L.I.; Jovin, T.M., Scanning force microscopy of circular and linear plasmid DNA spread on mica with a quaternary ammonium salt, Nucleic Acid Research, 1993a, vol. 21,

Schaper, A.; Wolthaus, L.; Mobius, D.; Jovin, T.M., Surface Morphology and Stabiligy of Langmir-Blodgett Mono and Multilayers of Saturated Fatty Acids by Scanning Force microscopy, Langmuir, 1993b, vol. 9, pg. 2178-2184

Schaper,A:; Starink,J.P.; Jovin,T.M., The Scanning Force Microscopy of DNA in Air and in n-Propanol Using new spreading agents, FEBS Letters, 1994, vol. 355, pg. 91-95

Sun,X.-G.; Cao,E.-H.; Zhang,X.-Y.; Liu,D.; Bai,C., The Divalent Cation-Induced DNA Condensation Studied by Atomic Force Microscopy and Spectra Analysis., Inorganic Chemistry Communications, 2002, 5/181-186,

Takamoto, D.Y.; Aydil,E.; Zasadzninski,J.A.; Ivanova,A.T.; Schwartz,D.K.; Yang,T.; Cremer,P., Stable Ordering in Langmuir-Blodgett films, Science, 2001, vol. 293

Tang, J.; Wang, Ch, Bai, C., Enhancement of resolution of DNA on silylated mica using atomic force microscopy, Journal of Vacuum Science Technology, 2000

Tanigawa, M.; Machida, M.; Okada, T., Hi resolved AFM measurement of DNA and DNA-protein complex, CCAB , 1997,

Tanigawa, M.; Okada, T., Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica, Analytical Chimica Acta, 1998, vol. 365, pgl. 19-25

Tätte, T.; Saal, K.; Kurg, A.; Lohmus, R.; Maeorg, U.; Rahi, M.; Rinken, A.; Lohmus, A.,

Preparation of Smooth Siloxane Surfaces for AFM visualization of Immobilized Biomolecules, Surface Science, 2003, vol. 532-535, pg. 1085-1091

Thundat T.; Allison D.P.; Warmack R.J.; Brown G.M.; Jacobson K.B.; Schrick J.J.; Ferrell TL, Atomic force Microscopy of DNA on Mica and Chemically Modified Mica, Scanning Microscopy, 1992, vol. 6, pg. 911-918

Umemura K; Nagami F; Okada T; Kuroda R, AFM characterization of single strand-specific endonuclease activity on linear DNA, Nucleic Acid Research, 2000, vol. 28. No.9

Vesenka J; Guthold M; Rang CL, Keller D, Delaine E, Bustamante C, Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope, Ultramicroscopy, 1992, pg. 1243-1249,

Wagner, P., Immobilization Strategies for Biological Scanning Probe Microscopy, FEBS Letters, 1998, vol. 430, pg. 112-115

Wang, H.; Bash,R.; Yods, J.G.; Hager, G.L.; Lohr, D.; Lindsay, S.M., Glutaraldehyde modified mica: a new surface for atomic force microscopy of chromatin, Biophysical Journal, 2002, vol. 83, pg. 3619-3625

Weisenhorn AL, Gaub HE, Hansma HG, Sinsheimer RL, Kelderman GL, Hansma PK., Imaging single-stranded DNA, antigen-antibody reaction and polymerized Langmuir-Blodgett films with an atomic force microscope, Scanning Microscopy, 1990, pg. 511-516

Weisenhorn A.L., Gaub H.E., Hansma H.G., Sinsheimer R.L., Kelderman G.L., Hansma P.K., Heyn, S.P., Ohnesorge, S.A.C.; Egger, M., Molecular-Resolution Images of Langmuir-Blodgett Films and DNA by Atomic Force Microscopy, Langmuir, 1991

Williams MC, Pant K, Rouzina I, Single molecule force spectroscopy studies of DNA denaturation by T4 gene 32 protein, Spectroscopy, 2004, vol. 18, pg. 203-211

Wu A.; Li Z.; Yu L.; Wang H.; Wang E., Plasmid DNA Network on a Mica Substrate Investigated by Atomic Force Microscopy, Analytical Sciences, 2001, 17

Wu J.; Zou X.; Liu H.; Shen G.; Yu R., A biosensor monitoring DNA hybridization based on polyaniline intercalated graphite oxide nanocomposite, Sensors and Actuators B, 2005 vol. 104, pg. 43-49

Xiao Z.; Xu M.; Sagisaka K.; Fujita D., AFM observations of self assembled lambda DNA network on silanized mica, Thin Solid Films, 2003, pg. 114-117

Xu X.-M.; Ikai A., Recovery and Amplification of Plasmid DNA with Atomic Force Microscopy and the Polymerase Chain Reaction, Analytical Chimica Acta, 1998, vol. 361, pg. 1-7

Yamaura M.; Camilo,R.L.; Sampaio,L.C.; Macedo,M.A.; Nakamura,M.;Toma,H.E., Preparation nad characterization fo (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, Jouranl of Magnetism and Magnetics Materials, 2004, vol. 279, pg. 210-217

Yang Y, Wang H, Erie DA, Quantitative characterization of biomolecular assemblies and ingeractions using atomic force microscopy, Methods, 2003. vol 29, pg. 175-187

Yang,G.; Vesenka,P.; Bustamante,C., Effects of Tip-Sample Forces and Humidity on the Imaging of DNA with a Scanning Force Microscopy, Scanning, 1996, vol. 18, pg. 344-350

Yang,J.; Mou,J.; Shao,Z., Molecular Resolution Atomic Force Microscopy of Solluble Proteins in Solution, Biochimica et Biophysica Acta, 1994, vol. 1199, pg. 105-114

Yang J; Sho Z, Effects of Probe Force on the Resolution of Atomic Force Microscopy of DNA, Ultramicroscopy, 1993, vol. 50, 157-170

You X.H.; Lowe C.R., AFM Studies of Protein Adsorption, Journal of Colloid and Interface Science, 1996, vol. 182, pg. 586-601

Yu M; Ivanisevic A, Encapsulated cells: an atomic force microscopy study, Biomaterials, 2004, vol. 25, pg. 3635-3662

Zheng J.; Li Z; Wu A.; Zhou H., AFM studies of DNA structures on mica in the presence of alkaline earth metal ions, Biophysical Chemistry, 2003, 104, pg. 34-43

Zlatanova, J.; Lindsay, S.M.; Leuba, S.H., Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope, Biophysics and Molecular Biology, 2000, vol. 74, pg. 37-61

Zuccheri, G.; Samori, B., SFM studies on the strucutre and dynamics of single DNA molecules, Methods in Cell Biology, 2005, in press

Vodrážka, Z., Biochemie, Academia 2000; pg.

Frank, Metody analýzy povrchů - iontové, sondové a speciální metody, Academia 2000

Rozsypal S., Úvod do molekulární biologie, I a II díl, pg ??, Academia, 2000

Carpentier R ed., Methods in Molecular Biology, vol. 274, *Photosynthesis Research Protocols*, Eva Hideg, Detection of Free Radicals and Reactive Oxygen Species, pg. 249-260., Humana Press Inc., 2004, Totowa, NJ

Morris, V.J., Kirby A.R., Guning, A.P., Atomic force microscopy for biologist, ICP 2001

Vůjtek M., AFM, mikroskopie skenující sondou, pokročilé cvičení z fyzikální chemie (nepublikováno)

Internetové odkazy:

<u>http://www.jpk.com/tutorial/afm\_sample\_preparation1.htm</u> - internetová stránka firmy JPK intrumetns.

<u>http://www.museum.mineral.cz/mineraly/ucebnice/dolni.php</u> - vysokoškolská internetová učebnice: Úvod do mineralogie.

http://www.veeco.com/default.asp - internetové stránky společnosti Veeco Meterology Group.

<u>http://www.2spi.com/catalog/submat/mic\_shet.shtml</u> - internetové stránky společnosti SPI supliemensts