

تعیین مدول کشسانی نمونه‌های زیستی با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

نفسه هاشمیان کاخکی^۱، سمیراسادات میرجلیلی^۲، صدیقه صادق حسنی^{۳*}، زهرا ثبات^۳

۱- مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، آزمایشگاه مرکزی

۲- یزد، شرکت تولیدی و تحقیقات صنعتی آسار کویر

۳- تهران، پژوهشگاه صنعت نفت، پژوهشکده کاتالیست و نانوفناوری

۴- تهران، شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو، کارگروه تخصصی SPM

پیام‌نگار: sadeghs@ripi.ir

چکیده

میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM)، علاوه بر قابلیت تصویربرداری از سطح نمونه، امکان به دست آوردن اطلاعاتی از خواص مکانیکی نمونه نظیر مدول الاستیک را فراهم می‌کند. استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی برای ایجاد نانوخرایش‌ها، آن را به یک ابزار مفید برای شناسایی ویژگی‌های الاستیک نمونه‌های زیستی مانند مدول یانگ تبدیل نموده است. نرم‌افزار JPK IP روش آسان و مناسبی برای به دست آوردن داده‌های کشسانی و محاسبه مدول یانگ می‌باشد.

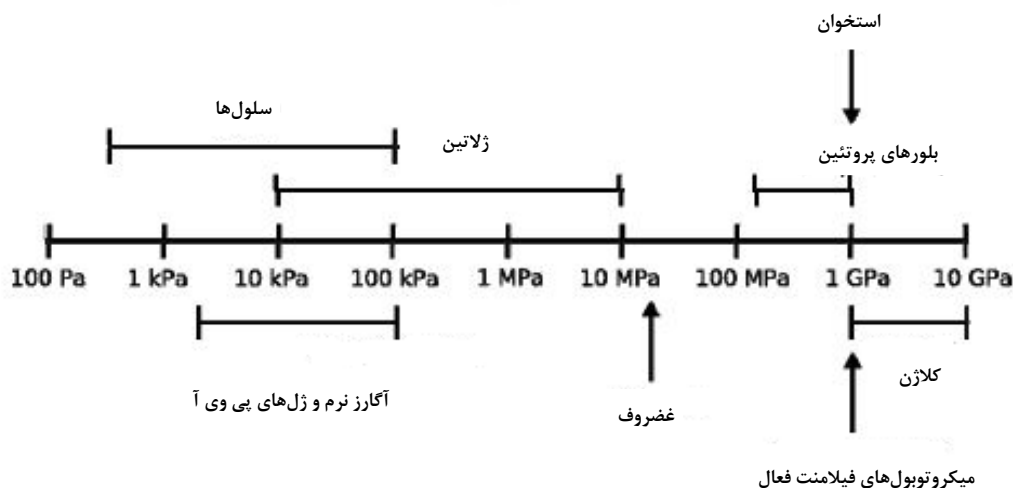
کلمات کلیدی: میکروسکوپ نیروی اتمی، مدول الاستیک، نانو خراش، نمونه‌های زیستی

۱- مقدمه

مختلف نشان داده شده است. یکی از کاربردهای میکروسکوپ نیروی اتمی، تعیین خواص الاستیک مواد است. متداول‌ترین مدل مورد استفاده با توجه به محدودیت‌های نمونه‌های زیستی، مدل هرتر است [۹-۱۰]. در این مقاله، کاربرد و نحوه استفاده از آزمایش‌های الاستیک با استفاده از روش AFM، شرح داده می‌شود. همچنین نمای کلی رایج‌ترین مدل مورد استفاده، مدل هرتر، بیان شده و فرض‌ها و محدودیت‌های حاصله برای استفاده در نمونه‌های زیست‌شناختی به دقت مورد بحث قرار می‌گیرد.

پس از اختراع میکروسکوپ نیروی اتمی در سال ۱۹۸۶ توسط بینینگ و همکارانش^۱ [۱]، به سرعت برای تحقیقات مختلف به کار گرفته شده است. هنگام استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی در ایجاد نانوخرایش‌ها، سوزن پروب به عنوان خراش‌دهنده‌های نرم نانویی عمل می‌کنند و امکان آزمایش و بررسی موضعی نمونه‌های کوچک و غیرهموزن مانند سلول‌ها و بافت‌ها و شناسایی ویژگی‌های الاستیک نمونه‌های زیستی مانند مدول الاستیک را فراهم می‌سازند [۲-۶]. در شکل (۱) میزان مدول الاستیک در نمونه‌های

1. Binnig



شکل ۱- نمای کلی مدول یانگ برای نمونه‌های زیست‌شناختی مختلف [۸-۷]

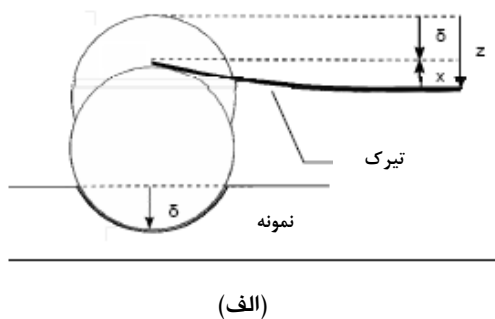
۲- مدل هرتز

در مدل هرتز، نمونه به صورت یک ایزوتروپ و جامد کشسان که نیمی از فضا را پر می‌کند در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این فرض می‌شود که خراش‌ها بدون تغییر شکل بوده و بین خراش‌ها و نمونه برهم‌کنشی وجود ندارد. اگر این شرایط حاصل شود، می‌توان مدول یانگ (E) نمونه را تعیین کرد و یا با استفاده از مدل هرتز محاسبه نمود. پارامترهایی که خواص نمونه و پروب خراش‌دهنده را توصیف می‌کنند، باید مشخص شوند.

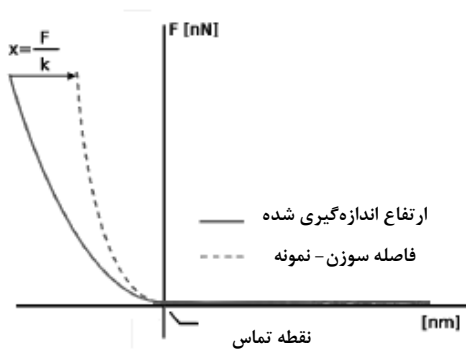
در حالت طیف سنجی نیرو، داده‌های بدست آمده به وسیله اندازه‌گیری خراش‌ها، معمولاً نیرو را برحسب جابجایی پیزو به جای فاصله سوزن - نمونه ترسیم می‌کند. برای بکارگیری مدل هرتز، لازم است منحنی‌ها به شیوه‌ای که در شکل (۲) شرح داده شده است، تبدیل شوند.

پارامتر توصیف‌کننده نمونه، نسبت پواسون (ν) نمونه است که به ماده بستگی دارد. نسبت یا ضریب پواسون، نسبت کرنش جانبی (عرضی) به کرنش محوری (طولی) است و وقتی که ϵ_{trans} کرنش جانبی و ϵ_{axial} کرنش محوری باشد، از رابطه‌ی زیر بدست می‌آید:

$$\nu = -\frac{\epsilon_{trans}}{\epsilon_{axial}}$$

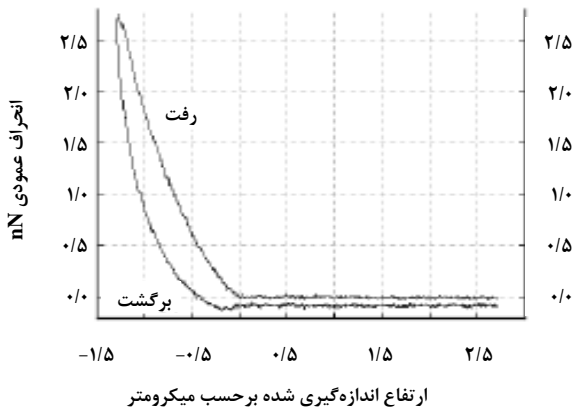


(الف)



(ب)

شکل ۲- (الف) طرحی از آزمایش ایجاد خراش. تیرک به سمت نمونه با فاصله Z (ارتفاع اندازه‌گیری شده) حرکت می‌کند. تیرک در جهت مخالف (X) خم می‌شود. در حالی که نمونه به میزان δ خراشیده می‌شود. در نهایت δ با کم کردن انحرافات تیرک از ارتفاع اندازه‌گیری شده، محاسبه می‌گردد. (ب) طرح اجمالی تصحیح ارتفاع خمیدگی تیرک (X) برای بدست آوردن فاصله (سوزن - نمونه). (منحنی نیروی خراش‌دهنده).



شکل ۳- منحنی نیرو که برای یک سلول CHO زنده تهیه شده است (سرعت روبش $5 \mu\text{m/s}$). منحنی رفت و منحنی برگشت به وضوح اثر پسماند مربوط به رفتار چسبندگی و پلاستیکی سلول را نشان می‌دهد [۱۴]

۵- محدوده مناسب

پیدا کردن محدوده مناسب برای بدست آوردن نتایج بهینه و تجدیدپذیر مورد استفاده در محاسبه حالت کشسانی، حائز اهمیت است. همان طوری که توصیف شد، E در خراش‌های بسیار کوچک، در اطراف نقطه تماس تغییر می‌کند اما با افزایش خراش، اساساً بدلیل سختی پایه (اسلاید شیشه ای و غیره، به شکل (۴) قسمت پایین) به یک سطح صاف می‌رسد تا در نهایت دوباره افزایش یابد. بنابراین ارتفاع ساختار خراش باید به‌طور جدی مد نظر قرار گیرد. مدل هرتز فقط برای خراش‌های کوچک معتبر است (تا $10-5$) ارتفاع سلول، حدود $(500-200)$ نانومتر) جایی که زیرپایه نمی‌تواند در محاسبات اثر گذاشته و جایی که ساختار هندسی خراش با ساختار هندسی خراش‌دهنده تطابق دارد. همان طور که در بالا در بخش هرتز توضیح داده شد، بهترین راه برای یافتن محدوده بهینه، ثبت منحنی نیرو - فاصله با خراش‌های نسبتاً بزرگ و تطبیق E برای هر نقطه متناظر با منحنی نیروی خراش است. رسم نمودار E در سراسر خراش، نشان می‌دهد در ایجاد خراش هنگامی که E به سمت یک مقدار ثابت تمایل پیدا کند، باید برای تعیین مدول یانگ استفاده شود (شکل (۴)، میانی). اما این موضوع زمانی اتفاق می‌افتد که هیچ سطح صاف واضحی به‌ویژه هنگام ایجاد خراش در نمونه‌های ناهمگن وجود نداشته باشد. به‌عنوان نمونه، اگر سلول دقیقاً بالای هسته و با

به‌طور کلی برای نمونه‌های نرم زیست‌شناختی (مواد غیر قابل تراکم نظیر لاستیک)، ضریب پواسون 0.5 تنظیم می‌شود. شکل هندسی خراش دهنده، تعیین‌کننده معادله مناسب برای استفاده است. مدل هرتز تماس سطحی بین ۲ کره را مطرح می‌کند اما برای خراش دهنده‌ها با ساختار هندسی متفاوت چندین مدل توسعه یافته است در مدل هرتز فرض می‌شود، خراش در مقایسه با ضخامت نمونه قابل صرف‌نظر کردن است، بنابراین عمق خراش باید بهینه شود. مدل هرتز برای خراش‌های کوچک، جایی که زیرپایه در محاسبات تأثیرگذار نیست، معتبر است (۵ تا 10% ارتفاع سلول، که ممکن است 200 تا 500 نانومتر گفته شود). اگر مدل شکل‌سوزن به صورت تقریبی باشد، ممکن است محدودیت‌های اضافی در عمق خراش‌ها به وجود آید. اگر خراش دهنده‌ها کروی باشند، اغلب از مدل‌های سهمی استفاده می‌شود، زیرا آنها آسان‌تر مطابقت یافته و این تخمین برای خراشیدگی‌های کوچک منطقی است. نرم افزار JPK IP برای همه شکل‌های خراش دهنده‌هایی که در این جا نشان داده شده است، تطابق خودکاری را ارائه می‌کند، بنابراین دیگر نیازی به این تخمین‌ها نیست [۱۱].

۳- تئوری کشسانی

حالت کشسان اجسام بزرگ در شرایط تنش و کرنش به‌وسیله قانون هوک^۱ بیان می‌شود. با استفاده از AFM، اندازه‌گیری‌های الاستیک به‌وسیله یک سوزن روی سطح نمونه انجام شده و منحنی‌های (نیرو-فاصله) تعیین می‌شود. این نتایج به‌صورت مجموعه‌ای از تغییر شکل‌های سوزن و تغییر شکل‌های قابل مشاهده در نمونه (قسمت‌های فرورفته تحت تأثیر سوزن) به‌دست می‌آید [۱۳-۱۲].

۴- خواص نمونه

در مدل هرتز فرض می‌شود نمونه همگن بوده و رفتار کاملاً کشسان دارد، اما اغلب مواد زیست‌شناختی هموزن نبوده و کاملاً الاستیک نیستند. انرژی که از سوی خراش‌دهنده اعمال می‌شود، به‌طور کامل به‌وسیله سلول پس داده نمی‌شود، بلکه به علت رفتار پلاستیکی که به صورت حلقه پسماند بین بخش‌های رفت و برگشت در منحنی نیرو ظاهر می‌شود، پراکنده می‌گردد (شکل (۳)).

1. Hooke's Law

در آزمایش فوق، بالای هسته (تصویر بالا در شکل (۴)) سختی هسته به صورت گذرا مشخص می‌شود. بدیهی است هسته‌هایی که پس از آن تحت فشار رانده می‌شوند، منجر به کاهش در مقدار E می‌شوند. بررسی‌های انجام شده در یک ناحیه نسبتاً یکنواخت (میانی) آشکار می‌کند که ایجاد خراش در سیتوپلاسم حتی در حدود ۲۵۰ nm نیز شروع می‌شود. ایجاد خراش در لبه سلول (پائینی) باعث می‌شود که افزایش ثانویه E (وابسته به زیرپایه) در خراش‌های نسبتاً کم آغاز شود.

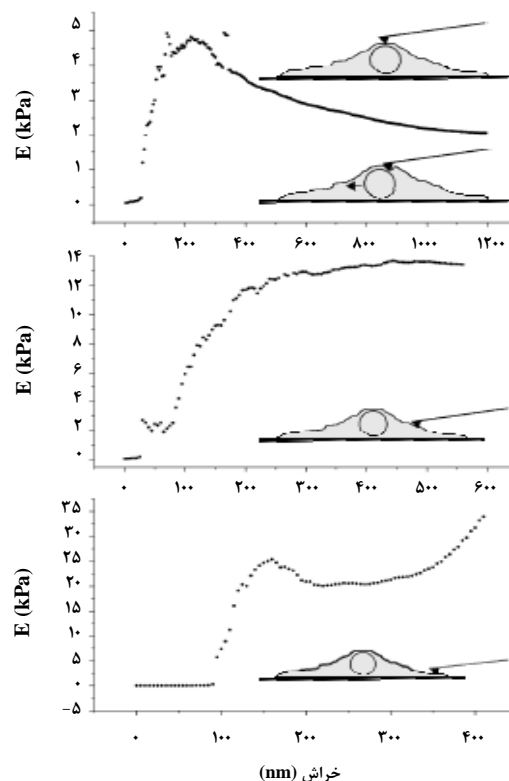
۶- انتخاب پروب

نوع تیرکی که باید مورد استفاده قرار گیرد به سختی نمونه وابسته است. به طور کلی می‌توان گفت که سختی تیرک باید در حدود سختی نمونه باشد. برای سلول‌هایی که بسیار ظریف و نرم هستند، باید نرم‌ترین تیرک موجود با ثابت فنری حدود (۱۰-۳۰) (mN/m) استفاده شود. برای نمونه‌های سخت‌تر مانند ژل‌های آگارز، ثابت فنری بالاتر (۳۰ تا ۱۰۰) (mN/m) یا بیشتر مناسب است.

نکته دیگری که باید مورد توجه قرار گیرد انتخاب شکل خراش‌دهنده‌هاست. برای نمونه‌های زیست‌شناختی نرم، استفاده از پروب‌های کروی توصیه می‌شود زیرا در این حالت نیرو نسبت به زمانی که از سوزن تیز هرمی یا مخروطی استفاده می‌شود، در ناحیه وسیع‌تری از نمونه اعمال شده و فشار کم‌تری حاصل می‌گردد. همچنین این روش از نفوذ پروب در نمونه ممانعت می‌کند. اما این موضوع تنها دلیل برتری خراش‌دهنده‌های کروی نیست. سلول‌ها یا بافت‌های بسیار ناهمگن شامل اجزای مختلفی (نظیر هسته‌ها، ترکیبات درون پلاسم و غیره) هستند. برای دستیابی به درک کلی در مورد چنین اجزاء غیریکنواختی، خراش‌دهنده‌های نسبتاً بزرگ‌تر (شبه مهره‌های ۲۰ μm) مناسب هستند. برای بدست آوردن توان تفکیک بالاتر به عنوان مثال، برای آزمایش تک سلول‌ها یا بخش‌هایی از سلول‌های مختلف، یا برای افزایش فشار برای ایجاد خراش بر روی ترکیبات سخت‌تر، مهره‌هایی با قطر کوچک‌تر می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (۱-۱۰) μm، بسته به توان تفکیک مورد نیاز). تیرک‌های کروی همیشه بهترین راه حل نیستند. اگر نمونه دارای ابعاد بسیار کوچکی باشد یا اگر بخش‌های مختلف با توان تفکیک بالاتر (بالاتر از ۱ میکرون) مورد آزمایش قرار گیرند،

استفاده از یک خراش‌دهنده نسبتاً کوچک آزمایش شود، (مثلاً هرم)، هسته می‌تواند از زیر پروب لغزیده و دقیقاً بعد از این که هسته به وسیله پروب تحت فشار قرار گرفت، نتیجه کاهش، میزان مدول اندازه‌گیری شده خواهد بود (شکل (۴) - بالا).

هر سه منحنی شکل (۴) از یک سلول و با یک پروب در شرایط یکسان بدست آمده است. گرچه هیچ‌گونه افزایش قابل ملاحظه‌ای در E وجود ندارد و بنابر این نشانه آشکار یا معمولی مبنی بر اثر زیرپایه شیشه‌ای بر هر دو منحنی E در برابر خراش مشاهده نمی‌شود، افزایش سختی ظاهری از مرکز سلول تا لبه آن، نشان‌دهنده اثر زیرپایه است. اما این باعث تعجب نیست زیرا ضخامت سلول در هسته حدود ۵ μm، در اطراف هسته حدود ۱/۳ μm و در لبه آن در حدود ۰/۵ μm اندازه‌گیری شده است. در نهایت نتایج نشان می‌دهند که تأثیر زیرپایه، نه تنها با افزایش E در منحنی E در برابر خراش قابل مشاهده است، بلکه با افزایش مقدار E در نواحی نازک‌تر سلول‌ها نیز دیده می‌شود.



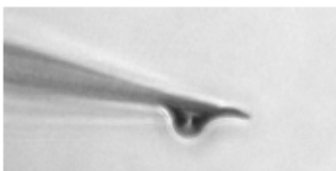
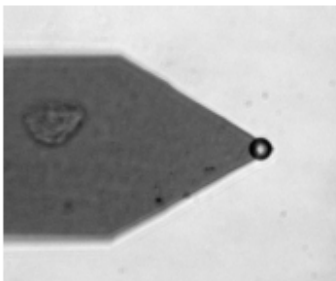
شکل ۴- منحنی‌های E در مقابل خراش برای یک سلول CHO که به وسیله خراش‌دهنده هرمی در نواحی مختلف دقیقاً بالای هسته (بالایی)، ناحیه نزدیک هسته (میانی) و نزدیک به لبه سلول (پائین) مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

همه آزمایش‌ها، سلول‌ها در شرایط فیزیولوژیکی (37°C)، و محیط کشت بافری (نگهداری می‌شوند).

۷- آماده‌سازی پروب

خرایش دهنده‌های کروی را می‌توان از تهیه کننده‌های خاص به صورت پروب‌های بسته‌ای (به صورت کره‌های شیشه‌ای $2/5-0/6 \mu\text{m}$) که به تیرک چسبیده است) تهیه نمود، یا می‌توان آنها را با چسباندن کره‌ها به تیرک به صورت دستی ساخت. برای این منظور به‌ویژه هنگامی که کره‌های کوچک چسبانده می‌شوند، تیرک‌های بدون نوک مناسب می‌باشند. اگر تیرک‌های با نوک انتخاب شوند، باید دقت شود زیرا کره بیشتر به کنار سوزن می‌چسبد تا به نوک آن، بنابراین سوزن در آزمایش مؤثر است، به‌ویژه هنگامی که قطر کره انتخابی کمتر از ارتفاع سوزن باشد. تیرک‌های سیلیکونی دارای سوزن‌هایی تا $15 \mu\text{m}$ می‌باشند. بنابراین تیرک‌های بدون سوزن، با حداقل تیرک‌های سیلیسیم نیتریدی که دارای سوزن‌های کوتاه‌تری (تا $5 \mu\text{m}$) هستند، انتخاب بهتری می‌باشند.

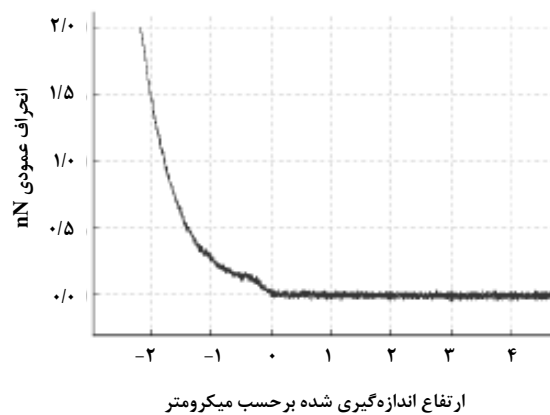
در آزمایش زیر از یک تیرک بدون سوزن ($k=0/03 \text{ N/m}$) با کره سیلیکایی (قطر $11 \mu\text{m}$) چسبیده به آن به عنوان پروب خراش‌دهنده استفاده می‌شود (شکل (۶)). گلوله سیلیکایی، با چسب اپوکسی دو قسمتی به تیرک چسبانده می‌شود، ولی چسب‌های زیست سازگار مانند چسب‌های نوری هم مناسب‌اند.



شکل ۶- تیرک بدون سوزن با یک کره $11 \mu\text{m}$ میکرونی چسبیده به آن

سوزن‌های هرمی سیلیسیم نیتریدی می‌توانند جایگزین شوند. یکی از اشکالات استفاده از سوزن‌های کم و بیش تیز، این است که این سوزن‌ها به درون نمونه نفوذ کرده و باعث محاسبه اشتباه مدول یانگ می‌شوند (عموماً باعث کاهش سختی می‌شوند).

اما از سوی دیگر این سوزن‌ها نسبت به خراش دهنده‌های کروی، از سوی ساختارهایی نظیر کشش سلولی یا پسماندهای کشیده شده از گلیکوکالیس^۱، کمتر به عقب رانده می‌شوند. خراش دهنده‌های کروی اغلب این کشیدگی‌ها را احساس کرده و نتیجه، نقاط تماسی بسیار کم عمق است که تعیین آنها فوق‌العاده دشوار می‌باشد. مشکل کلی‌تری که در سلول‌ها رخ می‌دهد، منحنی‌های نیرویی است که انحراف یافته و اغلب به صورت "شانه" در ناحیه تماس آشکار می‌شوند (شکل (۵)). این کجی و انحراف می‌تواند از برخورد با ساختارهای کوچک مانند رشته‌ها یا غشاءهای تحت تنش و کشش حاصل شود که سپس لغزیده و از پروب دور شده و منجر به دومین نقطه برخورد گردد.



شکل ۵- منحنی انحراف یافته که برای سلول CHO و با استفاده از خراش‌دهنده کروی $2 \mu\text{m}$ بدست آمده است.

۶-۱ مثالی از یک آزمایش ایجاد خراش

در این مثال بدست آوردن مدول یانگ از سلول‌های CHO زنده توصیف شده است. پروب کروی در آزمایش‌های ایجاد خراش مورد استفاده قرار می‌گیرد از یک پتری دیش به عنوان نگهدارنده نمونه استفاده می‌شود تا سلول‌ها بتوانند بر روی آن رشد کنند. در طول

1. Glycocalix

منحنی (نیرو - فاصله) مستقیماً از بالای هسته سلول‌های مختلف بدست می‌آید. معمولاً از نقطه تنظیم نسبتاً بالایی (بالای ۴ نانو نیوتن) استفاده می‌شود، زیرا خصوصیات مکانیکی این سلول‌ها ناشناخته است. سرعت در $5(\mu\text{m/s})$ تنظیم و از یک حلقه بسته استفاده می‌شود.

۹- پردازش داده‌ها

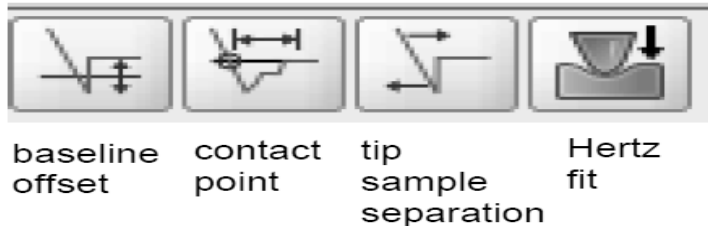
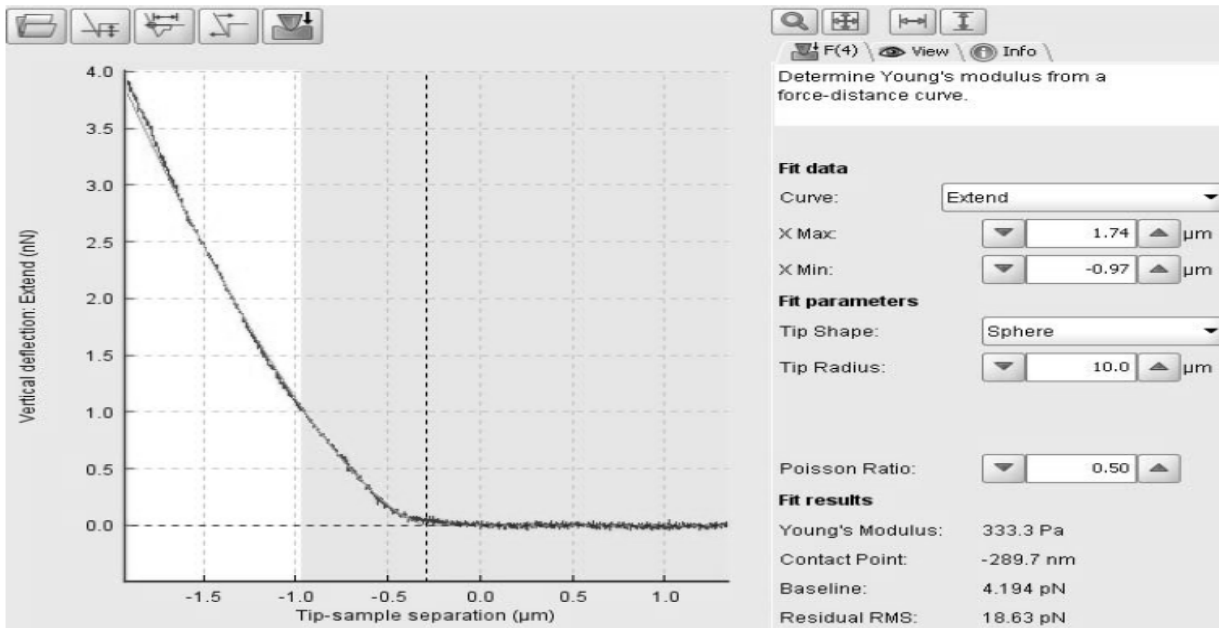
نرم‌افزار JPK IP این امکان را فراهم می‌کند که مدول یانگ از منحنی‌های نیرو در چندین مرحله بدست آید (شکل (۷)). همه عملیات باید برای منحنی در حالت رفت به کاربرده شود، زیرا در این حالت (به‌طور معمول یا حداقل در مایع) در بردارنده هیچ نوع برهم‌کنشی نظیر چسبندگی نیست که تعیین نقطه تماس را غیرممکن سازد. اولین مرحله پردازش، برطرف کردن هر گونه انحراف و کج شدگی از منحنی و پیدا کردن نقطه تماس است. بنابراین گزینه "تفریق خط زمینه" و "پیدا کردن نقطه تماس" انتخاب می‌شود. نیازی نیست که نقطه تماس یا انحراف خط زمینه دقیقاً تعیین شوند، زیرا آنها پارامترهای متغیری هستند و در نتایج تنظیم تأثیری ندارند. هر نوع کج شدگی باید از خط زمینه حذف شود، زیرا این بخشی از تنظیم مدل هرتز نیست. مرحله بعد تصحیح ارتفاع خم شدگی تیرک است، مشخصه‌ای که عمق خراش را با در نظر گرفتن اختلاف بین حرکت پیرو و انحراف عمودی تیرک در واحد طول محاسبه می‌کند. سپس منحنی‌ها آماده هستند تا برای بدست آمدن مدول یانگ با مدل هرتز تطبیق یابند. سایر مقادیر نظیر نقطه تماس تطبیق یافته و پارامتر کیفی "RMS باقی‌مانده" نیز نشان داده می‌شوند. اگر تعداد زیادی منحنی ثبت شوند، این امکان وجود دارد که بتوان با استفاده از پردازش، عملیات توصیف شده در مجموعه منحنی‌ها به کار برده شوند. بنابراین محدوده تطبیق باید به‌صورت گام به گام افزایش یابد تا مدول‌های E به سوی یک مقدار ثابت تمایل پیدا کنند. در شکل (۸) وابستگی مدول یانگ بدست آمده از یک سلول CHO با خراش، رسم شده است. در اینجا مقدار E از عمق حدود (۷۰۰-۸۰۰) نانومتری خراش، در یک مقدار ثابت می‌ماند.

این کار به آسانی می‌تواند با آماده‌سازی یک اسلاید میکروسکوپی که کره‌ها روی یک قسمت آن قرار گرفته و چسب اپوکسی در قسمت مجاور آن قرار دارد، انجام شود. اگر ذرات کروی به صورت معلق در یک مایع باشند، یک قطره از آن بر روی اسلاید قرار داده شده و خشک می‌شود. از یک پنس تمیز می‌توان برای انتقال دانه‌های خشک شده به اسلاید یا پخش نمودن محلول دانه‌ها استفاده کرد. سپس مقدار کمی از چسب اپوکسی با استفاده از یک تیغه یا سربیت به صورت لایه بسیار نازک در نزدیکی دانه‌ها پخش می‌شود. تیرک در ابتدا باید درون چسب فرو برده شود. برای پیدا کردن سطح باید این کار را بر روی ناحیه تمیزی از شیشه انجام داد. سپس سوزن تیرک با استفاده از پیچ‌های موقعیت یاب بر روی لبه بخش چسب اپوکسی قرار داده شده و اندازه گیری طیف‌سنجی نیرو برای فرو بردن سوزن درون چسب انجام می‌شود. نقطه تنظیم در محدوده 0.5 تا 1 ولت کافی است. اگر چسب به مقدار زیاد به سر سوزن بچسبد، می‌تواند دانه را کاملاً فرا بگیرد. برای جلوگیری از این کار، یک یا چند اندازه‌گیری طیف‌سنجی باید بر روی ناحیه تمیز شیشه‌ای انجام شود. این کار مقدار چسب‌های اضافی را از بین می‌برد. در پایان برای چسباندن کره، منحنی نیروی دیگری با سوزن استقرار یافته روی کره بدست می‌آید.

۸- آزمایش‌های ایجاد خراش

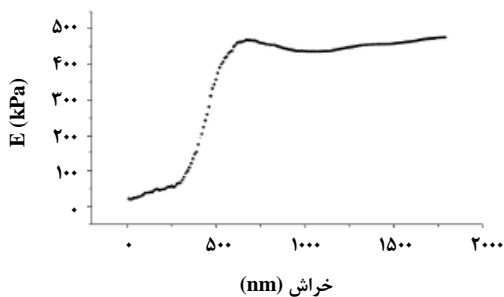
پروپ‌های کروی میکرونی در محل مخصوص میکروسکوپ AFM نصب شده و به‌صورت معمول تنظیم می‌شوند. پتری‌دیش شامل سلول‌های CHO به هم چسبیده، بر روی گرم‌کننده نصب شده و دما در 37°C تنظیم می‌شود. سپس تیرک کالیبره می‌شود، به‌عنوان مثال ثابت فتر تعیین شده می‌تواند برای تعیین دقیق نیروی اعمال شده بر روی نمونه استفاده شود. با استفاده از نرم‌افزار JPK SPM، فرایند درجه‌بندی انجام شده، با تنظیم منحنی نیرو (که بر روی پایه سخت بدست آمده است) در بخش مماس خطی حساسیت را محاسبه و با روش نوفه‌حرارتی^۱ ثابت فتر تعیین می‌شود. هنگامی که کالیبراسیون کامل شد، مجموعه نیروهای مطلوب بر حسب نیوتن (معمولاً پیکو یا نانو نیوتن) اعمال می‌شود. حال آزمایش می‌تواند شروع شود.

1. Thermal Noise



شکل ۷- عملیات بدست آوردن مدول یانگ از منحنی نیرو

اختلافاتی یافت می‌شود. برای ارزیابی چگونگی کار دستگاه و درک روش و مدیریت آن، اغلب مفید است که کار را با نمونه‌ای شروع کنیم که کشسانی آن با سامانه‌ای مشابه شرح داده شده باشد. ژل‌های بسیاری مثل آگارز یا پلی وینیل الکل نمونه‌هایی هستند که به خوبی توصیف شده و اغلب برای شرح اصول اندازه‌گیری‌های حالت کشسانی استفاده می‌شوند.



شکل ۸- منحنی مقدار E در مقابل خراش برای یک سلول CHO. در عمق حدود ۷۰۰ نانومتری خراش، سطح E به محدوده ثابت می‌رسد (حدوداً ۴۵۰ Pa).

در این محاسبات، نخستین مرحله، حذف هر گونه انحراف یا کج شدگی از خط زمینه و پیدا کردن نقطه تماس است. برای بهینه سازی تعیین نقطه تماس، منحنی می‌تواند هموار شود. مرحله تعیین کننده بعدی، تفریق خمیدگی تیرک از جابجایی پیزو برای دست‌یابی به خراش است، یعنی کانال جدیدی که جدایی نمونه و سوزن نامیده می‌شود، ایجاد می‌گردد. در پایان، مدل هر تزی می‌تواند اعمال شود. ساختار هندسی خراش‌دهنده نیز همراه با ضریب پواسون (حدود ۰/۵ برای نمونه‌های زیست‌شناختی) تعیین می‌شوند.

۱۰- آزمایش سامانه

مدول یانگ اغلب برای توصیف خواص مکانیکی سلول‌ها و دیگر نمونه‌ها استفاده می‌شود. در بسیاری از موارد منظور از انجام این آزمایش‌ها، مقایسه نتایج با داده‌های ارائه شده توسط دیگر محققان می‌باشد. با مقایسه مقالات، همواره بین مقدار E که در آزمایش‌های مشابه ولی با استفاده از دستگاه‌های مختلف بدست آمده است،

مطالعه نمودند. برای بدست آوردن بالاترین حد تفکیک در مواد زیست‌شناختی که دارای تغییر شکل ۱ نانومتری در جهت عمودی و ناحیه تماس چند نانومتری مربعی می‌باشند، نیروهایی در محدوده پیکونیوتن (۱۰-۱ پیکونیوتن) مورد نیاز است. تهیه تصویر از نمونه‌های نرم با افزایش مدول الاستیک نمونه، کاهش نیروهای چسبندگی (به عنوان مثال نیروی موینگی) و به حداقل رساندن نیروی اعمال شده، بهبود یافته است.

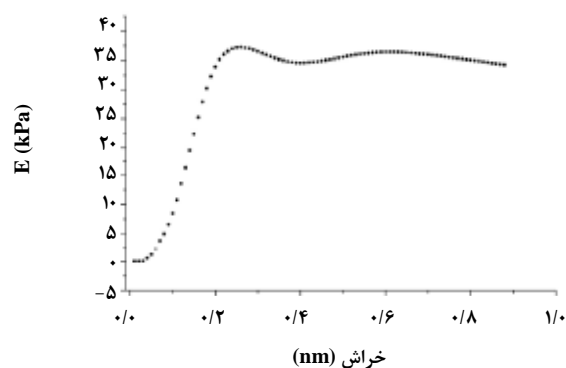
۱۲- نتیجه‌گیری

خواص مکانیکی مواد نظیر مدول یانگ را می‌توان با میکروسکوپ نیروی اتمی بدست آورد. همچنین به کمک آن امکان مطالعه ویسکوالاستیک و رفتار غیرکشسان نمونه‌های زیستی با جزئیات فراهم می‌شود. نرم افزار JPK IP نیز برای کسب داده‌های حالت کشسانی و محاسبه مدول یانگ برای نمونه‌های زیستی وسیله مناسبی است.

مراجع

- [1] Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C., "Atomic Force Microscope", Phys. Rev. Lett. 56, 930-933, (1986).
- [2] Docheva, D., Padula, D., Popov, C., Mutschler, W., Clausen-Schaumann, H., Schieker, M., "Researching in to the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy", Journal of cellular and Molecular, 12: 537-552, (2007).
- [3] Kunda, P., Pelling, A. E., Lin, T., Baum, B., "Moesin controls cortical rigidity, Cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis", Current Biology, 18:91-101, (2008).
- [4] Ludwig, T., Kirmse, R., Poole, K., Schwarz, U. S., "Probing cellular micro environments and tissue remodeling by atomic force microscopy", Pflugers Archiv: European Journal of physiology 456:29-49, (2008).
- [5] Lu, Y. B., Franze, K., Seifert, G., Steinhäuser, C., Kirchhoff, F., Wolburg, H., Guet, J., Janney, P., Wei, E. Q., Kas, J., Reichenbach, A., "Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS, PNAS", 103:17759-17764, (2006).
- [6] Brunner, C. A., Ehrlicher, A., Kohlstrunk, B., Knebel, D., Kas, J. A., Gogler, M., "Cell migration through small gaps, European Biophysical", Journal 35: 713-719, (2006).
- [7] Alonso, J. L., Goldmann, W. H., "Feeling the forces: Atomic force microscopy in cell biology", Life Sciences 72:2553-2560, (2003).
- [8] Hertz, H., "Über die Berührung fester elastischer Koper", Journal für die reine und angewandte Mathematic 92: 156-171, (1881).

برای امتحان سامانه‌ای که در آن آزمایش‌های سلولی انجام می‌شود، ژل آگارز ۲/۵ درصدی با استفاده از یک پروب کروی ۱۱ μm خراش داده می‌شود. از آنجایی که ژل‌های آگارز با این غلظت، از سلول‌ها سخت‌تر می‌باشند، باید از پروب‌های سخت‌تری به عنوان مثال با ثابت فنری $0.5-5(N/m)$ استفاده شود. در این مثال از یک تیرک NSC ($4N/m$) ساخت میکروشم استفاده شده است. منحنی مربوط به E در برابر خراش در شکل (۹) نشان داده شده و E نهایی را در حدود $36 Pa$ نشان می‌دهد. این مقدار با مقادیر ارائه شده در مقالات تطابق دارد [۹].



شکل ۹- منحنی E در مقابل خراش که برای منحنی نیرو - فاصله که روی ژل آگارز ۲/۵ درصدی و با استفاده از پروب کروی ۱۱ μm و ثابت فنری $4 N/m$ بدست آمده، محاسبه شده است. E نهایی حدوداً $36 Pa$ می‌باشد.

۱۱- اندازه‌گیری‌های الاستیسیته و توان تفکیک نهایی در تصاویر AFM

بدست آوردن توان تفکیک بالا در AFM به وسیله خراش‌های الاستیک محدود می‌شود. تصاویر تهیه شده از مواد زیست‌شناختی مانند سلول‌ها اغلب بدلیل تغییر شکلی که در اثر سوزن AFM در آن‌ها ایجاد می‌شود، دارای توان تفکیک پائینی هستند. زمانی که سوزن سطحی صاف را می‌خراشد، ناحیه تماس خاصی بین سوزن و نمونه ایجاد می‌شود. این شعاع تماس می‌تواند به عنوان بالاترین توان تفکیک بدون در نظر گرفتن ناهمواری سطوح اندازه‌گیری شود. رادمچر و همکاران او [۱۵] در آزمایشات الاستیک، ناحیه تماس را در ابعاد مختلف و بالاترین توان تفکیک بدست آمده در سلول‌ها را

- [9] Stolz, M., Raiteri, R., Daniels, A. U., VanLandingham, M. R., Baschong, W., Aebi, U., "Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation -Type Atomic Force Microscopy, Biophysical", Journal 86:3269-3283, (2004).
- [10] Touhami, A., Nysten, B., Dufrene, Y. F., "Nanoscale Mapping of the Elasticity of Microbial Cells by Atomic Force Microscopy", Langmuir 19:4539-4543, (2003).
- [11] Lin, D. C., Dimitridas, E. K., Horkay, F., "Robust strategies for automated AFM force curve analysis- I. Non-adhesive indentation of soft, inhomogeneous materials", ASME 129:430-440, (2007).
- [12] Timoshenko, S. P., Goodier, J. N., "Theory of Elasticity", McGraw-Hill, London, (1970).
- [13] Heuberger, M., Dietler, G., Schlapbach, L., "Mapping the Local Young's Modulus by Analysis of the Elastic Deformations Occurring in Atomic-Force Microscopy", Nanotechnology, 6(1):12-23, (1995).
- [14] Rosenblith, M. J., Lam, W. A., Fletcher, D. A., "Force microscopy of nonadherent cells: A comparison of leukemia cell deformability", BiophysJ 90: 2994-3003, (2006).
- [15] Radmacher, M., "Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM", IEEE Eng. Med. Biol. Mag , 16, 47-57, (1997).