

# Az atomerő mikroszkópia (AFM) alkalmazása bioérzékelő kutatásban

## A bioérzékelő kutatás lehetőségei

Napjainkban egyre fokozódik a tudományos és ipari érdeklődés a bioérzékelők iránt. 2009-ben a bioérzékelők világpiaca kb. 11 milliárd USD forgalmat bonyolított [1], miközben 2010-re az évente megjelenő bírált szakfolyóirat cikkek száma az ezres nagyságrendet is meghaladta a témakörben [2]. Bár a bioérzékelők alkalmazási területe rendkívül szerteágazó, olyan előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek minden területen megtérítik a kutatásukra fordított energiát és anyagiakat. Egyszerűségük és gyorsaságuk mellett egyik legfontosabb tulajdonságuk nagyfokú szelektivitásuk, melyet az érzékelési funkciót megvalósító, biológiailag aktív anyagok biztosítanak. A természetben előforduló „kulcs-zár” mechanizmusokat kiaknázó affinitás típusú bioérzékelők családjába tartoznak a DNS szenzorok, amelyek működési elve a komplementer ss-DNS szálak specifikus összekötődésén, azaz hibridizációján alapul (ss: single stranded – egyszálú). A DNS chipek sokoldalúságának és elterjedésének oka, hogy a ma már könnyen kivitelezhető DNS szintézis révén tetszőleges bázissorrendű ss-DNS receptorokat tudunk előállítani a detektálandó cél-DNS bázissorrendjének megfelelően és ezeket rákos megbetegedések illetve kórokozók detektálásához, gén-analízishez és környezeti vizsgálatokhoz is tudjuk használni. A cél-DNS molekulák bekötődésének detektálására fluoreszcens jelölést alkalmazó optikai vagy jelölésmentes elektrokémiai, optikai ill. tömegspektrometriás eljárásokat használnak elterjedten a gyakorlatban.

A Budapesti Műszaki Egyetem Elektronikai Technológia Tanszékének (BME-ETT) műszerparkja 2008-ban ipari kapcsolatok támogatásával egy Veeco diInnova típusú pásztázó mikroszkóppal (SPM – Scanning Probe Microscope) bővült (1. ábra). A többek közt kontakt és pengetéses (tapping) AFM (Atomic Force Microscopy) üzemmódokban működtethető diInnova SPM azzal az egyedülálló lehetőséggel bír, hogy atomi felbontásra képes képalkotásával vizuálisan is karakterizálhatóvá teszi a nanométeres tartományokban mozgó DNS-bioreceptor rétegeket.

## Az AFM képalkotás elve

Az AFM-es képalkotás elvét a legelterjedtebben használt kontakt üzemmód bemutatásával a 2. ábra szemlélteti. A vizsgálandó minta felületével egy hegyes tű érintkezik, melynek hossza kb. 2  $\mu\text{m}$ , hegyének átmérője pedig kisebb, mint 10 nm és amely egy 100-200  $\mu\text{m}$  hosszú „rugós tartókonzol” (továbbiakban az egyszerűség kedvéért kantilever) végén helyezkedik el [3]. A kantilever rugóállandója kisebb, mint a vizsgált mintát alkotó atomok összetartó ereje, ezért a tű hegye és a minta felülete között ébredő atomi erők képesek elhajlítani a kantilevert, miközben a tű mozgása során közelebb kerül a felülethez, vagy eltávolodik attól. A kantilever elhajlását egy a felületéről visszaverődő lézernyalábbal és fotodetektorokkal alkalmazhatjuk képalkotásra. A BME-ETT diInnova típusú mikroszkópjában egy négyszegmenses pozíció érzékeny fotodetektor található (PSPD – Position Sensitive Photo Detector vagy QPD – Quad Photo Detector). A felső és alsó két-két szegmens különbségét képezve ((A+B)-(C+D)) a kantilever vertikális, a jobb oldali és bal oldali két-két szegmens különbségét képezve pedig ((A+C)-(B+D)) a kantilever laterális elhajlásáról kapunk információt. Az így előállított vertikális eltérülési jelet egy egyszerű visszacsatolós szabályozási kör használja fel a szkanner Z irányú mozgására. Első lépésben a jelet egy differenciál erősítő összehasonlítja egy előzetesen beállított referencia (továbbiakban setpoint) értékkel, majd az ebből képzett hibajelet a visszacsatolás vezérlő felszorozza egy PID szabályozó erősítő paramétereivel. Ez a

Z irányú vezérlőjel egyrészt a piezoelektromos szkennert magasságát szabályozza, másrészt ezt használjuk fel képalkotásra kombinálva a szkennert generátor XY irányú kitérítő jeleivel. A setpoint értékkel adhatjuk meg azt, hogy a tű hegye milyen távol helyezkedjen el a minta felületétől (a visszacsatolási kör ezt az értéket igyekszik fenntartani a hibajel minimalizálásával), míg a PDI szabályozó paramétereivel szimbolikusan azt állíthatjuk be, hogy a tű mozgása mennyire dinamikusan kövesse a felület váltakozásait.

A pengetés (tapping) mód esetén a kantilevert állandó amplitúdójú és frekvenciájú gerjesztőjellel rezgésre kényszerítjük. A felület közelében a reakciók hatására változhat a rezgés amplitúdója és fázisa, ezeket használjuk a képalkotáshoz. A pengetés mód egyik előnye a kontakt móddal szemben, hogy a különböző anyagminőségű felületekről más fázisban verődik vissza a tű, így a fázisjelből előállított képen jobban kivehetők a felületen lévő eltérő anyagok.

A pont-spektroszkópia vizsgálati módban nem végzünk X-Y irányú pásztázást, hanem adott erővel (vagy adott távolságra) leeresztjük a tűt egy pontban a felületre, majd visszahúzzuk onnan. Az eljárást elsősorban lokális jelenségek vizsgálatára (vonzás, taszítás, tapadás) és a felület egyes mechanikai paramétereinek meghatározására használhatjuk. A 3. ábra szemlélteti az eljárás működési elvét. A felülethez közelítve a tűt (A vektor) egy ponton a vonzó hatások következtében a tű a felületre ugrik, ami a kantilever kismértékű domborodásával jár (jump to contact – B vektor). További nyomóerőt kifejtve a felülettel kontaktáló kantilever rugalmasságának határáig homorodik, ami pozitív jelet okoz a fotodetektorban (C vektor). Távolodva a felülettől a vonzó hatásokból származó adhézió miatt a tű nem válik el egyből a felülettől, hanem rugalmasságának határáig domborodik és csak utána szakad el a felülettől (D és E vektor). A tű kontaktálása közben a C és D vektorok által meghatározott egyenes meredeksége a tű felületre jellemző rugalmassága, mértékegysége Z-kitérés/elhajlás, azaz [nm/mV]. Ezen paraméter megállapítása az egyes felületekre azoknál az alkalmazásoknál lehet fontos, ahol a tű által kifejtett nyomóerőt a beállítható setpointtal szeretnénk szabályozni. A kifejtett nyomóerőt általánosan Hooke törvénye által számíthatjuk ki ( $F = -k \cdot x$ , ahol  $F$  az erő [N],  $k$  a rugóállandó [N/m] és  $x$  a Z irányú kitérés mértéke [m]). A tű felületre jellemző rugalmasságának pont spektroszkópiás megállapításával lehetőségünk nyílik átírni Hooke törvényét úgy, hogy a setpointtal változtathassuk a nyomóerőt:  $F = -k \cdot R \cdot U_{sp}$ , ahol  $F$  a tű által kifejtett erő [nN],  $k$  a tű adatlapból kikereshető rugóállandója [nN/nm],  $R$  a tű felületre jellemző, pont spektroszkópiával megállapított rugalmassága [nm/mV] és  $U_{sp}$  a szoftveresen állítható setpoint [mV].

## Atomi simaságú hordozók előállítása

Normál kémiai körülmények között egy receptorként alkalmazott pl. 15 bázispár hosszú ss-DNS szál hossza kb. 5 nm (a DNS molekula hossza kb. 0,33 nm bázispáronként). Ezért az AFM-es képalkotás szempontjából a DNS szálak rögzítésére használt hordozó felületi érdessége meghatározó jelentőségű a nanométeres tartományokban mozgó DNS rétegek megjeleníthetősége szempontjából. Ma az optikai illetve elektrokémiai transzducerekben legelterjedtebben arany vékonyréteg elektródokat használnak, melyekhez kovalens kötéses eljárással rögzítik a receptor-DNS szálakat (DNS immobilizáció). A szálak 5' végére egy tiol csoportot (SH – kénhidrogén) szintetizálva a kén-arany kovalens kötés képes egy pontban rögzíteni az arany vékonyréteg felületén a DNS szálakat, melyek többi része az oldatban szabadon lebegve elérhető a cél-DNS molekulák számára a hibridizációhoz.

Arany vékonyréteg elektródokat a legegyszerűbben üveghordozón hozhatunk létre vákuumpárolgatással illetve vákuumporlasztással, titán vagy króm tapadást segítő réteg felhasználásával. A 4. ábrán látható kontakt módú AFM-es képen jól kivehető a párolgatással felvitt arany (100 nm arany, 40 nm titánium üveghordozón) polikristályos, szemcsés szerkezete. A szemcsék

mérete függ a technológiai paramétereiktől, de az átmérőjük a legjobb esetben sem kisebb 40-50 nm-nél. Az ilyen technológiával előállított arany vékonyrétegek felületi érdessége tehát nem elég jó ahhoz, hogy rajtuk nanorétegeket lehessen karakterizálni.

Atomi simaságú aranyfelületek előállítására használható a mica replika készítés technika, melynek technológiai folyamatát az 5. ábra szemlélteti [5]. A mica hasított csillám (a nevét a latin micare – csillogó szó alapján kapta), felületi érdessége egyes parcellákban akár atomi simaságú is lehet. A felületére vákuumpárolgatással vagy porlasztással felvitt arany vékonyréteget kétfázisú epoxi ragasztóval erősíthetjük üveghordozóhoz. A folyamat végén a mica szelet könnyen eltávolítható, az arany vékonyréteg pedig lemásolva a mica felületi tulajdonságait közel atomi simaságú lesz.

## Nanoborotválás

Az AFM nanoborotválás (nanoshaving) technika lényege, hogy a tű hegyét AFM pásztázás alatt erősebben hozzányomva a felülethez eltávolíthatunk már lekötött receptor-DNS szájakat [6]. Kellően nagymértékű nyomóerő alkalmazása esetén a teljes pásztázási területről (scan area) eltávolíthatjuk a receptor réteget (6. ábra). Fontos a „borotválást” folyadék alatt (pl. fluidikai cellában) végezni, így a felületről eltávolított DNS szájak visszaoldódhatnak a folyadékba és a borotvált mintázat határán nem gyűlik fel az eltávolított anyag. A lecsupaszított terület és az ép réteg magassága közötti eltérésből lehet következtetni a rétegvastagságra, ebből pedig a DNS immobilizáció, majd az érzékelési reakció után a hibridizáció mértékére. A nanoborotválás egyik előnye, hogy az egyébként nanoméretű molekulák rétegeként kezelhetők, így viselkedésük vizsgálatához nem kell lemenni az AFM felbontóképességének határáig. A nanoborotválás során a tű által kifejtett nyomóerő 100 nN körül van. Az erő mértéke a setpointtal szabályozható a pont spektroszkópiánál ismertetett módon.

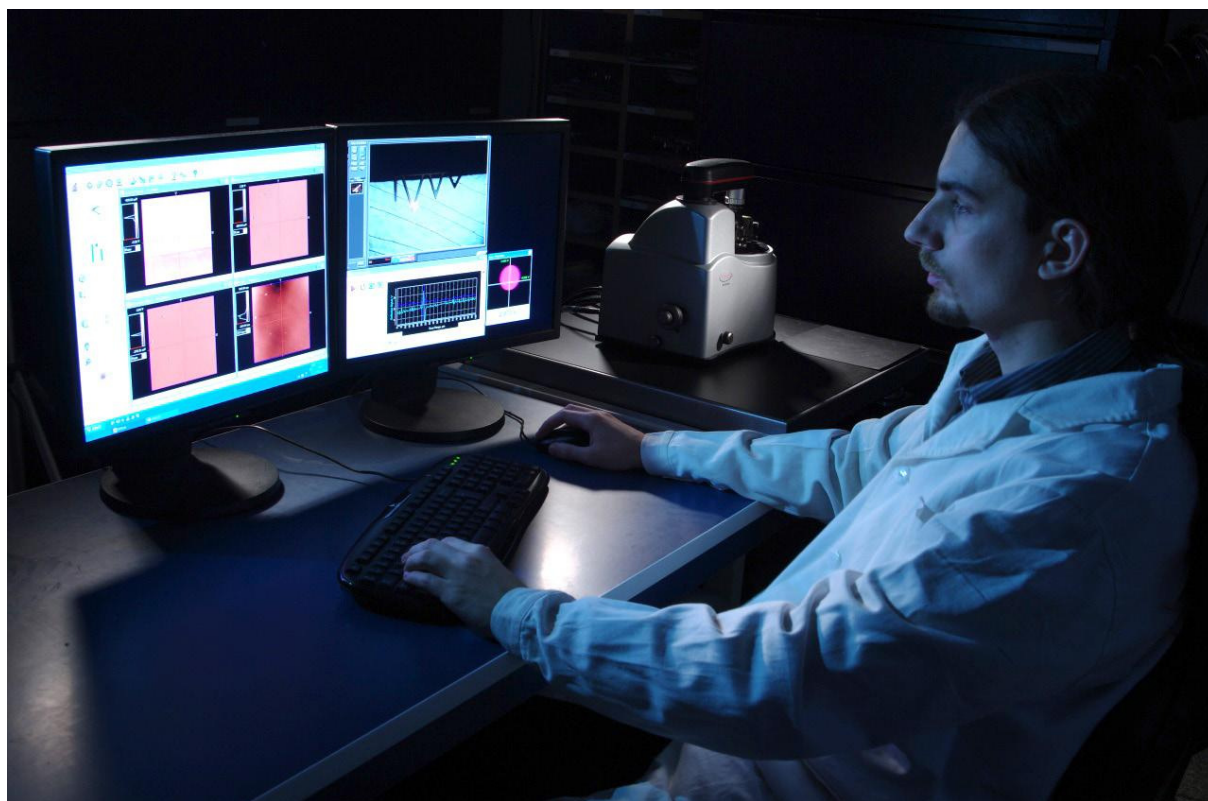
A 7. ábrán egy példa látható DNS receptorréteg AFM nanoborotválásos vizsgálatára. A keresztmetszeti képből megállapítható egyrészt, hogy a pásztázás által felfedett, 500 nm-es szakaszon a mica replika arany vékonyréteg maximális szintkülönbsége 0,5 nm alatt van, tehát ténylegesen közel atomi simaságú (az arany atomok átmérője kb. 1,7 Ångstrom = 0,17 nm [7]). Másrészt a DNS réteg 1,9 nm-es vastagságából arra lehet következtetni, hogy a DNS szájak vertikálisan nem nyúlnak ki maximális hosszukra, kompakt réteget alkotnak. Ez a látványos eredmény jól demonstrálja, hogy az AFM-es technikák képesek biológiai nanorétegek vizuális megjelenítésére és hogy alkalmazásukkal a BME-ETT is „átléphet a nanovilág kapuján”. (A képet Dr. Giampaolo Zuccheri és Bonyár Attila készítette Veeco MultiMode típusú SPM-el a Bolognai Egyetem Biokémiai Intézetének AFM laboratóriumában, 2008-ban.)

## Referenciák

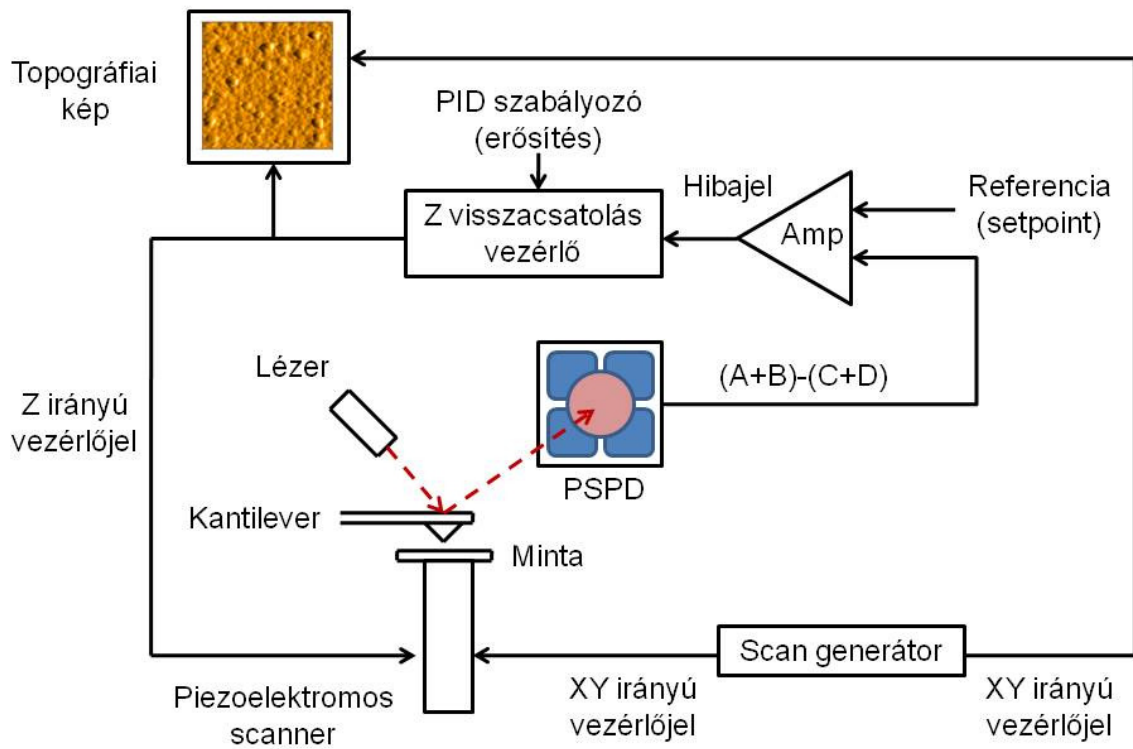
- [1] Anthony P. F. Turner, „Planary Lecture: Biosensors for diabetes care”, 1st Biosensing Technology Conference, 10-12. November 2009, Bristol, UK, in Delegate Manual
- [2]
- [3] Veeco, “diInnova SPM & Software Manual”, 004-1005-000, May 2007
- [4] Veeco, “SPM Training Notebook”, *Manual*, 2003
- [5] Martin Hegner, Peter Wagner, Giorgio Semenza, "Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy", *Surface Science*, Vol. 293, 1993, pp. 39-46.

[6] Xu S. and G.-Y. Liu, "Nanometer scale fabrication by simultaneous nanoshaving and molecular self-assembly", Langmuir, 1997, 13: pp. 127-129.

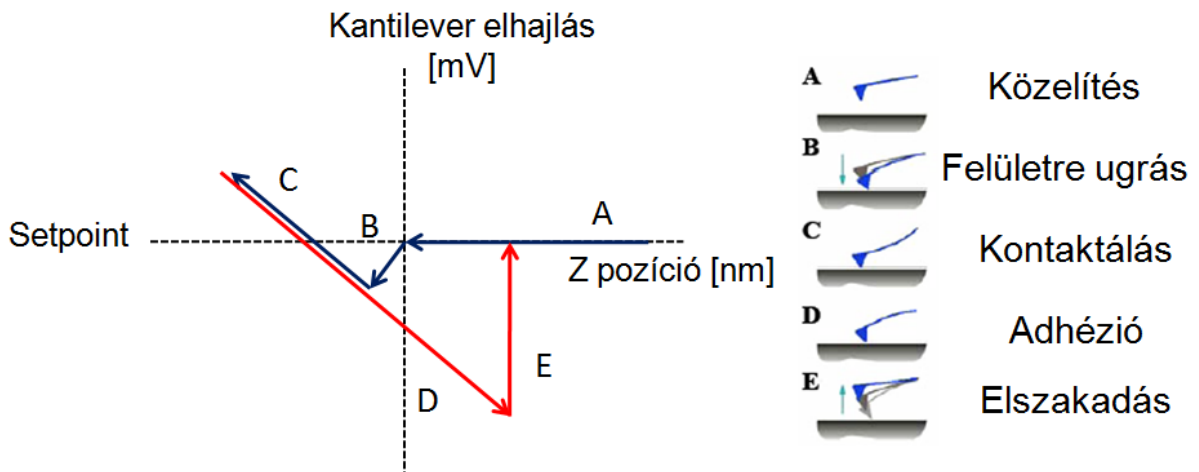
[7] [http://www.webelements.com/gold/atom\\_sizes.html](http://www.webelements.com/gold/atom_sizes.html)



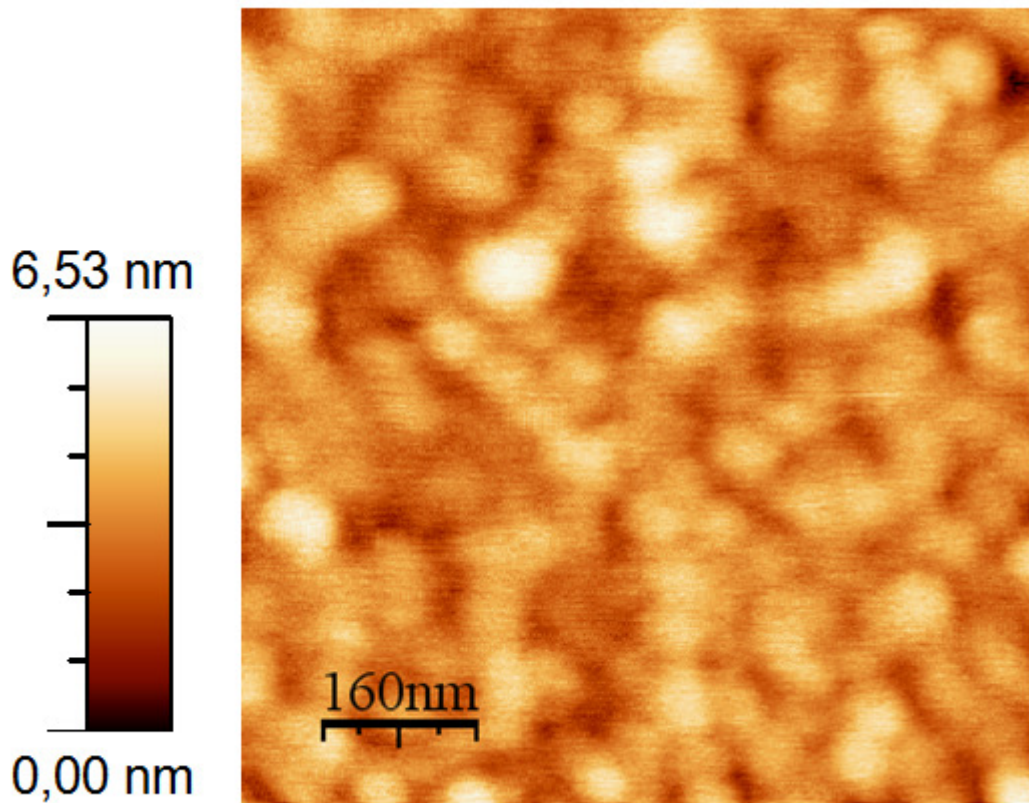
1. ábra: A BME-ETT Veeco diInnova SPM-je működés közben



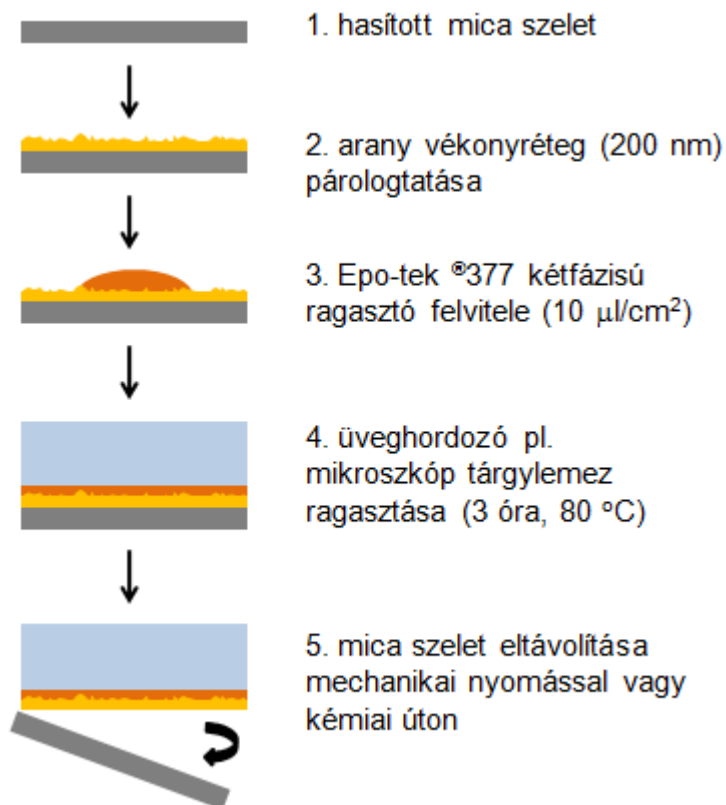
2. ábra: A kontakt üzemmódú AFM képalkotás elve



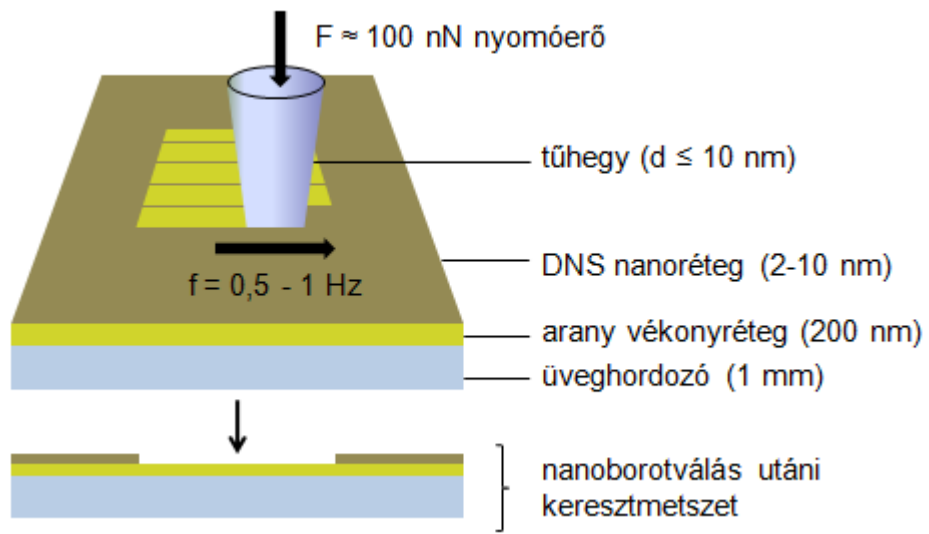
3. ábra: A pont spektroszkópia működésének elve kalibrációs ábrán szemléltetve (force calibration plot) [4].



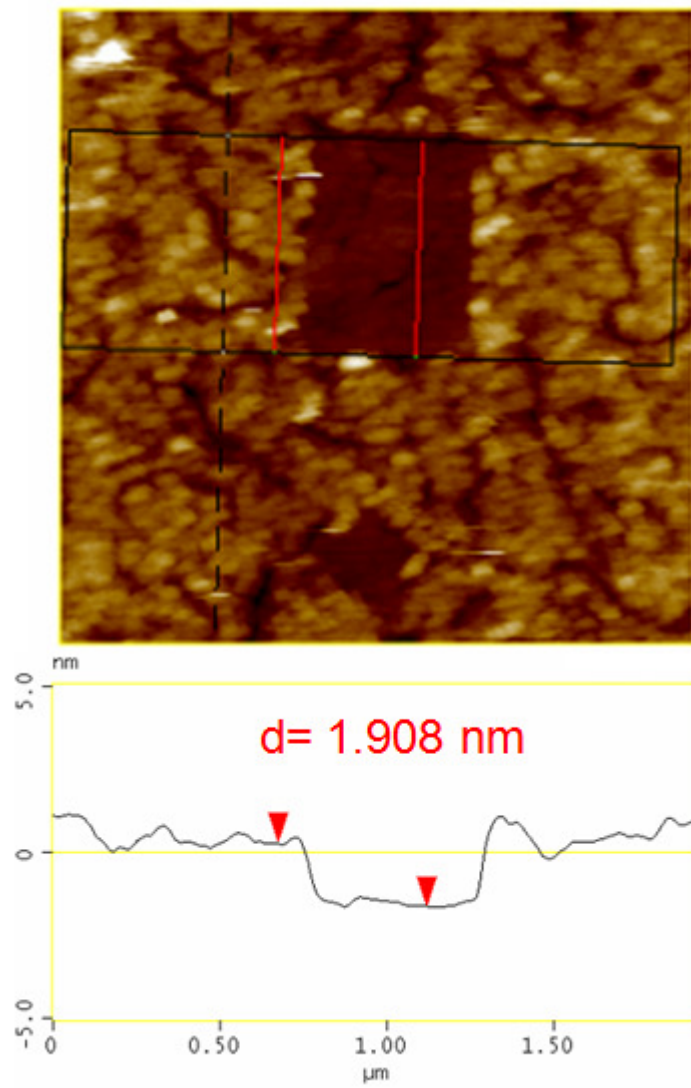
4. ábra: Polikristályos arany vékonyrétegről készült kontakt üzemmódú AFM kép (BME-ETT)



5. ábra: A mica replika készítés technológiai folyamata



6. ábra: A nanoborotválás eljárás illusztrációja



7. ábra: DNS receptorréteg nanoborotválása és keresztmetszeti vizsgálata