

## نویسندگان

پروین هادیان<sup>۱\*</sup>سمیرا عطایی<sup>۲</sup>، مریم خراشادی زاده<sup>۳</sup>

\*parvinhadian@gmail.com

# حالت‌های کاری میکروسکوپ نیروی اتمی در زیست‌شناسی و استخراج اطلاعات کمی

## واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ نیروی اتمی، منحنی نیرو - فاصله،  
زیست‌شناسی، تیرک، سلول زنده.

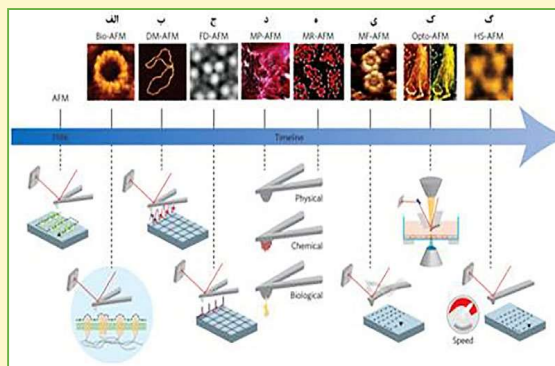
## چکیده

میکروسکوپ نیروی اتمی<sup>۵</sup> به‌عنوان ابزاری قدرتمند امکان تهیه تصویر از نمونه‌های زیستی از مولکول‌های منفرد تا سلول‌های زنده را فراهم کرده و کنترل و مطالعه آن‌ها را میسر می‌کند. محققان بلافاصله بعد از اختراع AFM دریافتند که برای بیشتر نمودن فرصت‌های تهیه تصویر آن در نمونه‌های زیستی و رفع محدودیت‌های این روش، همگام با فناوری، پیشرفت این میکروسکوپ مورد نیاز است، لذا این مسئله باعث بوجود آمدن حالت‌های جدیدی از تهیه تصویر شد که به پیشبرد توانایی‌های این روش کمک کرد. در اینجا مبانی اولیه، مزایا و محدودیت‌های رایج‌ترین حالت‌های تهیه تصویر در زیست‌شناسی و حالت‌های توسعه یافته جدید مبتنی بر استخراج اطلاعات کمی مانند تهیه تصویر چند عاملی، چند فرکانسی، تشخیص مولکولی و تهیه تصویر با سرعت بالا مورد بررسی قرار داده می‌شود.

## مقدمه

اختراع AFM در سال ۱۹۸۶ نقطه عطفی در تاریخ فناوری نانو است و فرصت‌های مطالعاتی جدیدی را در فیزیک، شیمی، علوم زیستی و پزشکی به‌وجود آورد. به کمک این میکروسکوپ، سطح با کنترل نیروهای فعال بین یک پروب نازک و سطح شبیه‌سازی می‌شود. امکان تهیه تصویر در سطح اتمی در طول یکسال از اختراع آن فراهم شد، اما چند سالی طول کشید تا تهیه تصویر از سطوح غیررسانا در خلاء امکان‌پذیر شود. در همان زمان این روش برای کار کردن در یک مقیاس دمایی وسیع و تقریباً در هر محیطی به‌کار رفت. توانایی بررسی سطوح با نسبت سیگنال به نوفه<sup>۶</sup> استثنایی و با توان تفکیک کمتر از نانومتر، باعث پیشرفت روش‌های مرتبط با AFM شد که پروب‌های متفاوتی را برای کنترل برهم‌کنش مواد، مورد استفاده قرار داد. انعطاف منحصر به فرد AFM برای تهیه تصویر و کنترل مواد، باعث شد تا به پرکاربردترین ابزار در علم فناوری نانو تبدیل شود و باعث به ثمر رسیدن اکتشافات و فناوری‌های فراوان شد. توانایی کار

شکل ۱: خط سیر زمانی از نوآوری‌های کلیدی در AFM. از تولد در ۱۹۸۶ تا آخرین پیشرفت‌های انجام شده در روش‌های تهیه تصویر با کمک AFM در علوم زیستی. نوآوری‌های کلیدی که در طول سالیان ایجاد شده‌اند عبارت است از: الف- سیستم آشکارسازی مبتنی بر انعکاس نور و سلول مایع برای کار کردن در محیط آبی و در حالت کاری تماسی (Bio-AFM)، تصویر بالا: الیگومر کلروپلاست. ب- حالت کاری دینامیکی AFM که با ارتعاش تیرک، نیروهای ناشی از اصطکاک را کاهش داده و توانایی روبش نمونه‌های زیستی را دارد<sup>۷</sup>، تصویر بالا: DNA. ج- AFM مبتنی بر منحنی نیرو - فاصله که برای پیکسل به پیکسل تصویر، منحنی مورد نظر اندازه‌گیری شده و اطلاعات کمی از خواص نمونه در اختیار قرار داده می‌شود<sup>۸</sup>، تصویر بالا: پروتئین‌های غشایی. د- AFM چند متغیره که هنگام روبش سطح نمونه، چندین ویژگی فیزیکی یا شیمیایی را نقشه‌برداری می‌کند<sup>۹</sup>، سلول‌های اپیدرم پوست انسان. ه- AFM مجهز به تهیه تصویر تشخیص مولکولی که نقشه‌هایی از برهم‌کنش‌های خاص مولکولی را آشکارسازی می‌کند<sup>۱۰</sup>، تصویر بالا: سلول مخمر. ی- AFM چند فرکانسی به منظور تهیه نقشه از برهم‌کنش‌های زیستی نمونه بر اساس مرتعش کردن سوزن در چند فرکانس و نقشه‌برداری از متغیرهای فیزیکی<sup>۱۱</sup>، تصویر بالا: آنتی‌بادی مونوکلونال. ک- AFM جفت شده با سیستم‌های نوری برای تهیه تصویر از سیستم‌های پیچیده زیستی بطور هم‌زمان با میکروسکوپ نوری و (Opto-AFM)، تصویر بالا: فیبروبلاست جین موش. گ- AFM با سرعت بالا که زمان تهیه تصویر را ۱۰۰۰ برابر تسریع می‌کند و بدین ترتیب مشاهده فرآیندهای پویای زیستی مقدور می‌شود<sup>۱۲</sup>، تصویر بالا: پروتئین باکتریورودوپسین. بیشتر این عملکردها مکمل یکدیگر هستند و در نهایت به AFM ترکیبی منجر می‌شوند [۱].



مقالات مروری بسیاری در دو دهه اخیر منتشر شده‌اند که حالت‌های تهیه تصویر خاصی از AFM را برای مشخص کردن خواص سیستم‌های زیستی معرفی می‌کند. در اینجا در نظر داریم تا بررسی اجمالی بر حالت‌های متفاوت تهیه تصویر در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و استخراج اطلاعات کمی را همراه با محدودیت‌های کنونی و فرصت‌های آینده مشخص کنیم. در اینجا سلول به تمامی سلول‌های استخراج شده، غشاهای سنتزی، پروتئین‌های خالص شده و اسیدهای آمینه اطلاق شده‌است.

کردن AFM در دمای محیط و محیط مایع، AFM را به سمت علوم زیستی سوق داد. برای نشان دادن پیچیدگی سیستم‌های زیستی که می‌تواند از نوکلئیک اسیدها تا سلول‌ها و بافت‌ها وسعت یابد، حالت‌های کاری متفاوتی از AFM در طول سالیان به وجود آمده است (شکل ۱). در دهه‌های اخیر پیشرفت‌های مهمی در تهیه تصویر با وضوح بالا به دست آمده است، از جمله میکروسکوپ ابر وضوح<sup>۱۳</sup> یا میکروسکوپ الکترونی کرایو<sup>۱۴</sup> که به شکل جعبه ابزار تهیه تصویر کنونی منجر شده‌است. (جدول ۱)

جدول ۱: مقایسه روش‌های تهیه تصویر با وضوح بالا در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

میکروسکوپ الکترونی روبشی <sup>۱۹</sup>	میکروسکوپ الکترونی عبوری <sup>۱۸</sup>	میکروسکوپ ابر وضوح (STED <sup>۱۵</sup> , PALM <sup>۱۶</sup> , STORM <sup>۱۷</sup> )	میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)	روش
۲ nm-۱۰ nm	۰/۲ nm-۱۰ nm	۲۰ nm-۵۰ nm	≤۱ nm- ۵۰ nm *	وضوح
منجمد کردن/خشک کردن نقطه بحرانی و پوشش دهی فلزی	قرارگیری نمونه روی گرید، بدون آب	نشانگذاری فلورسنت، برای نمونه‌های فیزیولوژیکی تحت کنترل (دما، محلول بافر و CO <sub>2</sub> )	قرارگیری نمونه روی تکیه‌گاه، برای نمونه‌های فیزیولوژیکی تحت کنترل (دما، محلول بافر و CO <sub>2</sub> )	آماده‌سازی نمونه و محیط
خشک شدن، پوشش فلزی، آسیب پرتو الکترونی	خشک شدن، تشکیل بلور یخ، آسیب پرتو الکترونی	سفیدشدگی، سمیت	سوزن، نیرو، فرایند روبش	اثرات ناخواسته
تهیه تصویر از سطوح بافت، سلول و فصل مشترک‌ها با وضوح نانومتری	دسترسی به ساختار سه بعدی و آرایش فضایی پروتئین‌ها، عکس‌برداری با وضوح مولکولی از ساختارهای درون سلول	دست‌یابی به ساختار سه بعدی بافت سلولی، وضوح فضایی زمانی بالا. کنترل فرایندهای زیست مولکولی در سلول‌های زنده	تهیه تصویر در شرایط طبیعی، بدون نیاز به رنگ کردن، نشان‌دار کردن و ثابت کردن. نسبت سیگنال به نویز بالا. ارزیابی چندگانه متغیرهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی	مزایا
ناتوانی در مطالعه فرایندهای زنده	ناتوانی در مطالعه فرایندهای زنده	نشان‌گذاری فلورسنت	بسیار وابسته به سطح نمونه	محدودیت‌ها

\* برای پروتئین‌های غشایی توان تفکیک کمتر از یک نانومتر قابل دست‌یابی است؛ این مقدار برای سلول‌های پستاندارن تقریباً ۵۰ نانومتر و

برای سلول‌های میکروبی ۱۰ نانومتر است [۱].

## تفکر مبتنی بر ریسک

کلید راه‌گشایی که به کاربرد AFM در سیستم‌های زیستی انجامید، پیشرفت یک سیستم آشکارسازی نوری بود که با طراحی یک سل مایع ادامه پیدا کرد و امکان تهیه تصویر در حلال بافر را فراهم آورد؛ بنابراین، حالت بومی سیستم زیستی را در هنگام مطالعه حفظ کرد. اولین حالت تهیه تصویر AFM حالت تماسی است که در آن سوزن روی سطح نمونه قرار گرفته و آن را روبش کند، بطوری که ارتفاع قله‌ها و عمق دره‌ها را پیکسل به پیکسل تنظیم می‌کند و نیروی اعمال شده بین سوزن و نمونه ثابت باقی می‌ماند [۲] (شکل (۲-الف) چپ). تصویر نهایی ارتفاع همان توپوگرافی سطح نمونه است و وضوح تصویر به شعاع نوک سوزن، پستی و های سطح نمونه، خواص فیزیکی نمونه و چگونگی کارکرد سیستم بازخورد در مواجهه با نمونه زیستی نرم وابسته است. بلافاصله بعد از معرفی اولین AFM تجاری قابل دسترس، تهیه تصویر از انواع نمونه‌های زیستی شامل سلول‌های حیوانی، غشاء سلولی و پروتئین‌های غشایی، DNA، RNA و لایه‌های لیپیدی ایجاد شد. برای سطوح نرم و صاف مانند پروتئین‌هایی که از غشاء  $\sim 1$  nm خارج می‌شوند، حالت تماسی AFM می‌تواند توپوگرافی آنها را با وضوح جانبی و عمودی  $< 1$  nm و  $< 0.1$  nm فراهم کند (شکل (۲-ب)). قدرت تفکیک و نسبت سیگنال به نوفه بالای AFM، امکان آشکارساز شدن حالت ای هندسی مرتبط با عملکرد مختلف پروتئین‌های محلول در آب و غشاء را فراهم می‌کند. با به کار بردن AFM در حالت تماسی می‌توان مورفولوژی دینامیکی سلول‌ها، رشد پاتولوژیکی فبره‌های آمیلوئیدی، تخریب آنزیمی DNA و غشاهای لیپیدی را نمایان کرده و حقایق از چگونگی کارکرد حفره ای خارجی غشای باکتری‌ها، اتصالات بین سلولی حیوانی و پیچیدگی‌های حفره‌های هسته را آشکارسازی کند. از دیگر مثال‌های مهیج، بررسی ورود سموم پاتولوژیک به غشاها و یا طراحی ابرمولکول‌های غشاهای فتوسنتزکننده و تغییرات آنها به نور است. با این حال، گر چه حالت کاری تماسی AFM به‌طور وسیعی برای شناسایی سطوح جامد مورد استفاده قرار می‌گیرد، کاربرد آن در سیستم‌های زیستی نرم، نیاز به تخصص بالا برای تنظیم نیروی اعمال شده بین نوک سوزن و نمونه دارد. به‌عنوان یک قاعده کلی، از نیروهای بیشتر از ۱۰۰ pN باید اجتناب شود زیرا ممکن است سطح نمونه دچار تغییرات غیرقابل برگشت شود. به همین علت تهیه تصویر در حالت کاری دینامیکی (که در ابتدا الت ضربه‌زنی یا نوسانی نامیده می‌شد) به‌منظور به حداقل‌رسانی اصطکاک و نیروهای بکار رفته بین سوزن و نمونه اختراع شد [۳] (شکل (۲-الف) راست). در ساده‌ترین کاربرد، تیرک در فرکانس رزونانس خود مرتعش شده و در همان حالت سطح نمونه را روبش می‌کند. به‌طور ایده‌آل، سوزن تنها در پایین‌ترین حالت حرکت خود سطح نمونه را لمس می‌کند، بنابراین به‌طور قابل ملاحظه‌ای اصطکاک را به حداقل می‌رساند. لذا در نزدیکی سطح نمونه، اثر متقابل بین سوزن و نمونه، دامنه و فرکانس رزونانس تیرک را

غیر می‌دهد در نتیجه اجازه داده می‌شود آن نیز به‌عنوان عوامل مدار بازخورد برای تهیه تصویر نمونه‌های زیستی شکننده و حساس مورد استفاده قرار گیرند.

استفاده از دامنه به‌عنوان سیگنال مدار بازخورد از لحاظ فنی ساده‌تر است، زیرا فقط یک حلقه بازخورد نیاز دارد؛ در مقایسه با آن، فرکانس به سه حلقه بازخورد نیاز دارد. بنابراین، AFM مدولاسیون دامنه در حال حاضر بیشتر از AFM مدولاسیون فرکانس استفاده می‌شود. علاوه بر این دو حالت تهیه تصویر شناخته شده AFM، حالت‌های دینامیکی دیگری نیز توسعه پیدا کرده‌اند که سیگنال‌های متفاوتی را به‌عنوان عوامل بازخورد استفاده می‌کنند و یا اینکه تیرک را در فرکانس‌های متفاوتی به‌طور هم‌زمان تحریک می‌کنند. همان‌گونه که حالت‌های کاری مختلف دینامیکی، نیروهای اعمال شده بین سوزن و نمونه و اصطکاک را کاهش می‌دهند، می‌توانند برای تهیه تصویر نمونه‌های زیستی که به‌طور ضعیف، جذب سطحی می‌شوند مانند DNA، پروتئین‌های منفرد و فیلامنت‌ها نیز به‌کار روند. به هر حال، کنتراست توپوگرافی نمایانگر برهم‌کنش‌های پیچیده بین سوزن AFM و نمونه است به‌طوری‌که سختی، زبری، بار سطحی، شیمی سطح و اصطکاک می‌تواند باعث تغییر نوسان سوزن شده و منجر به تغییر یا برعکس شدن کنتراست شود. لذا به‌منظور ثبت تصاویر دارای صحت و وضوح بالا، تهیه تصویر سیستم‌های زیستی ناشناخته در کنار نمونه‌های کاملاً شناخته شده، می‌تواند راهکار مناسبی باشد [۴].

در سیستم‌های زیستی، حالت‌های کاری دینامیکی و تماسی AFM، تصاویر توپوگرافی با توان تفکیک پایین‌تر از محدوده توان تفکیک میکروسکوپ‌های نوری ارائه می‌دهند. سادگی استفاده و نسبت سیگنال به نوفه بالای AFM باعث پیدایش این امید شد که AFM باعث انقلابی در تهیه تصویر سلول می‌شود، اما تنها قسمتی از این رویا به تحقق پیوسته است. به‌عنوان مثال، وضوح تصاویر سطح سلول حیوانی به علت سطح نرم و چین‌دار آن در محدوده ۵۰-۱۰۰ nm باقی ماند [۵]. برعکس سلول‌های حیوانی، سطوح میکروبوها که به‌طور مکانیکی سخت‌تر و معمولاً صاف‌تر هستند با وضوح  $\sim 10$  nm تهیه تصویر شد [۶]. با این حال پلی‌ساکاریدهای غشای پلاسما باعث آلودگی سوزن شده و تغییر در کنتراست تصویر را به همراه دارد. یک رویکرد فوق‌العاده در تهیه تصویر سلول‌های زنده و جلوگیری از آلودگی سوزن، یکی از مشتقات AFM، میکروسکوپ هدایت یونی روشی<sup>۲۰</sup> است که از نانوپیت‌ها برای اندازه‌گیری جریان یونی نمونه استفاده می‌شود. بنابراین، جریان یونی برای کنترل موقعیت عمودی نانوپیت و در نتیجه شبیه‌سازی توپوگرافی نمونه استفاده می‌شود. در صورت کنترل صحیح، این عامل بازخورد می‌تواند به‌منظور اجتناب از تماس فیزیکی بین پیت و سلول تنظیم شود. در نتیجه، می‌تواند با نوسان سلولی زنده را که شامل سلول‌های مو یا نرون پوکامپ هستند را با وضوح بالا ( $\sim 50$  nm) شبیه‌سازی کند [۷]. با این حال، به‌منظور به‌کارگیری وسیع‌تر SICM، نیاز است تا محدودیت‌هایی مانند سرعت پردازش پایین



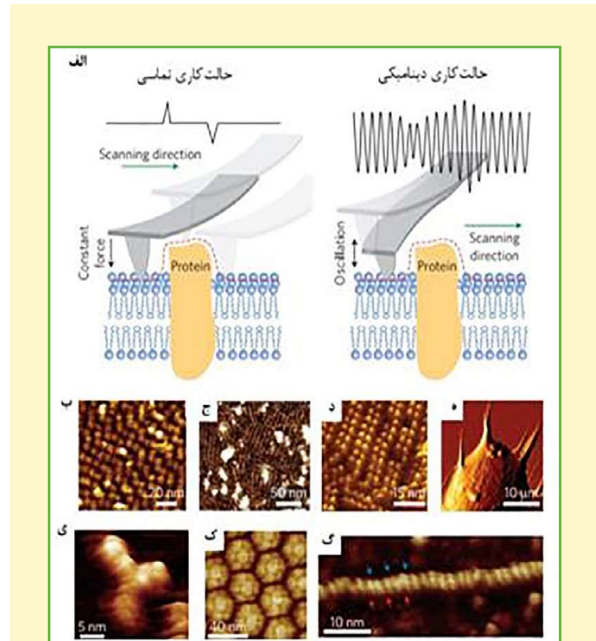
## از منحنی نیرو - فاصله تا تهیه تصویر چند متغیره

و اثرات ناشی از بزرگی شعاع پروب SICM با سطوح سلول ای بین خورده حل شود.

سوالی که پیش آمد این بود که آیا AFM قادر به استخراج اطلاعاتی فراتر از تهیه تصویر هست یا خیر؟ پاسخ این سوال به توانایی AFM در شناسایی خواص بیوفیزیکی مواد اشاره دارد. در ابتدا، چنین مشخصه‌هایی با نزدیک کردن سوزن AFM به نمونه ای زیستی (منحنی رفت) و برگرداندن آن به حالت اولیه (منحنی برگشت) و ثبت منحنی‌های نیرو - فاصله اندازه‌گیری شد. منحنی رفت، اطلاعات کمی از ارتفاع، نیروهای سطح، نیروهای تغییر شکل مکانیکی نمونه یا ماژول ای کشسانی و اتلاف انرژی را در اختیار قرار می‌دهد. منحنی برگشت امکان اندازه‌گیری نیروهای چسبندگی را فراهم می‌کند (شکل ۳-الف)). برای استخراج اطلاعات صحیح و قابل اعتماد، کنترل دقیق برهم‌کنش‌های بین سوزن و نمونه، همراه با آگاهی از هندسه صحیح سوزن و شیمی سطح نمونه، نیاز اساسی است. امروزه تیرک‌های تجاری در دسترس هستند که در اشکال، شعاع نوک سوزن و مشخصه‌های فیزیکی و شیمیایی دلخواه تعریف شده‌اند. همان‌طور که در ادامه به‌طور مفصل تشریح می‌شود، حالت‌های تهیه تصویر مختلفی برای استخراج اطلاعات از خواص نمونه در هنگام تهیه تصویر از آن توسعه یافته‌اند. رویکردی رایج و متنوع در این میان، حالت تهیه تصویر مبتنی بر منحنی FD است که سوزن AFM منحنی رفت و برگشت را برای هر پیکسل از تهیه تصویر اندازه‌گیری می‌کند (شکل ۳-ب)).

AFM مدرن قادر به اندازه ری چند صد هزار منحنی FD در هنگام تهیه تصویر نمونه زیستی هستند، همان‌طور که هر منحنی FD به‌طور موضعی خواص فیزیکی را به‌صورت کمی اندازه ری می‌کند، این اطلاعات به‌طور مستقیم و هم‌زمان می‌توانند به توپوگرافی سطح نمونه مرتبط شوند. دستگاه AFM که قادر به اندازه‌گیری منحنی FD در هر پیکسل از تصویر باشد، می‌تواند برای تهیه تصویر سیستم‌های زیستی پیچیده و به‌طور هم‌زمان ارزیابی کمی و تهیه نقشه از خواص فیزیکی نمونه مانند خواص کشسانی و چسبندگی (شکل‌های ۳-ج و ۳-د)) مورد استفاده قرار گیرد. در هر صورت، با وجودی که AFM در مکان‌یابی سوزن در راستای X, Y, Z دارای دقت بسیار بالایی است، غالباً تعیین نقطه تماس بین سوزن و نمونه دچار چالش می‌شود و این وضعیت برای سطوح زبر و نمونه زیستی نرم، دشوارتر نیز می‌شود. لذا آگاهی از موقعیت نقطه تماس برای تفاوت قائل شدن بین نیروهای سطح از نیروهایی که باعث تغییر شکل مکانیکی سلول‌های نرم می‌شود، لازم است. با این حال، برای بیشتر کاربردها، برون‌یابی خطی ناحیه تماس به نیروی صفر دقیق است (شکل ۳-ب)).

در حال حاضر، رایج‌ترین استفاده از AFM مبتنی بر منحنی نیرو یا FD، تهیه نقشه خواص مکانیکی سیستم‌های زیستی است. این مسئله بسیار مهم است، زیرا عملکرد سلول مبتنی بر خواص مکانیکی آن است. از جمله اقدامات اولیه در این راستا تهیه تصویر نقشه از اسکلت سلولی فیبروبلاست‌ها [۹] پس از تزریق دارو و تهیه نقشه سختی از سلول ای کورتکس در حین تقسیم سلولی است [۱۰] (شکل ۳-د)). نقشه‌برداری از خواص ویسکوالاستیسیته



شکل ۲: تهیه تصویر سیستم‌های زیستی طبیعی با وضوح مولکولی. الف- اصول حالت‌های کاری تماسی (چپ) و دینامیکی (راست). در حالت تماسی انحراف تیرک به واسطه تنظیم ارتفاع نسبی بین سوزن و نمونه ثابت نگه داشته می‌شود (نیروی ثابت). تغییر در ارتفاع، باعث تغییر انحنای تیرک می‌شود که به‌عنوان سیگنال مدار باز خورد فاصله مناسب را معین می‌کند. در حالت دینامیکی، تغییر ارتفاع موجب تغییر در نوسان تیرک می‌شود که دوباره مدار باز خورد با تغییر فاصله از تغییر فرکانس یا دامنه جلوگیری می‌کند. از ب تا ه- تصاویر AFM در حالت کاری تماسی است که عبارتند از ب- نوکلئوتیدهای حلقوی آرایش یافته در کانال پتاسیومی. ج و د- ردیف‌های دایمر رودوپسین که به‌طور فشرده در غشای یاخته‌های استوانه‌ای شبکه چشم وجود دارند. ه- تصویر یک سلول زنده (SAOS-A2) با کشیدن فیبریل‌های کلژن روی زیرلایه. ی تا گ- تصاویر در حالت کاری دینامیکی. ی- پادتن IgG جذب شده روی زیرلایه میکا با تهیه تصویر مدولاسیون فرکانس. ک- یک لایه از ویروس‌های موزاییکی چارو<sup>۲۱</sup> محبوس شده درون مجتمع بلوری. گ- پلاسمید DNA مدور<sup>۲۲</sup> با تهیه تصویر در محلول باری با حالت کاری مدولاسیون فرکانس. فلش‌های قرمز و آبی رنگ به ترتیب شیارهای بزرگ و کوچک DNA را نشان می‌دهند [۱].

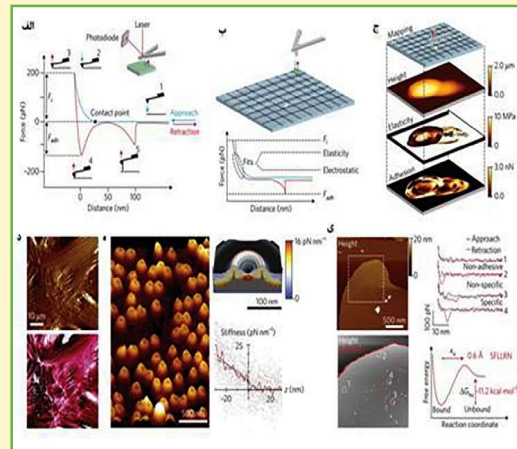
در نهایت می‌توان گفت AFM، نه تنها می‌تواند برای تصویرسازی بلکه برای دستکاری نمونه‌های زیستی نیز مورد استفاده قرار گیرد. نیروی بکار رفته شده بین سوزن AFM و نمونه می‌تواند به سادگی برای دستکاری مکانیکی استفاده شود. همچنین می‌توان سوزن را با گروه‌های شیمیایی عامل‌دار کرد و برهم نش آن را تنها با نمونه هدف مطالعه نمود. قابلیت کنترل فیزیکی سیستم ای زیستی راه شای پیشرفت سوزن‌های جدید AFM است به‌طوری‌که به‌عنوان نانوآبزار برای برش، برداشتن و آزاد کردن مولکول‌های زیستی با دقت نانومتری و حتی کنترل تقسیم سلولی حیوانات نیز استفاده شده است [۸].

نمونه، نیروی به کار رفته برای تهیه تصویر، فاصله بین سوزن و نمونه و خواص نمونه زیستی مرتبط است. همچنین حضور زیاد نیروهای بلندبرد باعث کاهش وضوح تصویر می‌شود. زمانی که یک تصویر با اندازه خاص ثبت می‌شود تعداد پیکسل‌های ثبت شده، تعیین کننده وضوح تصویر به صورت تئوری است. گرچه، تعداد پیکسل‌ها و تعداد منحنی‌های FD نیز با عامل زمان محدود می‌شوند. در AFM‌های اولیه مبتنی بر منحنی نیرو، زمان مورد نیاز برای تهیه یک منحنی نیرو در محدوده ۰/۱ s تا ۱۰ s بوده است، در نتیجه زمان مورد نیاز برای تهیه تصویر مبتنی بر منحنی نیرو با تعداد پیکسل‌های ۳۲×۳۲ بین ۲-۳ ساعت است. این سرعت پایین، استفاده از تصاویر مبتنی بر منحنی نیرو را در زیست‌شناسی محدود کرده بود، اما معرفی عناصر پیزوالکتریک با سرعت پاسخ بالا، حلقه‌های بازخورد مناسب، سیستم‌های جامع جمع‌آوری اطلاعات و تغییر حالت‌های نوسان‌سازی تیرک، تا حد زیادی این مشکل را حل کرد [۱۲]. در نتیجه، در حال حاضر AFM مبتنی بر منحنی نیرو می‌تواند تصاویرهای چند عاملی ۵۱۲×۵۱۲ پیکسل را از سیستم‌های زیستی با وضوح ۱ nm در زمان ۳۰-۱۵ دقیقه ثبت کند [۱۳]. برای مثال، امروزه این روش می‌تواند برای تهیه تصویر پروتئین‌های غشایی به صورت منفرد و با وضوح ۱ nm استفاده شود و به طور هم‌زمان خواص مکانیکی ساختارهای ثانویه آن‌ها را از لپیدهای میانی تمیز دهد. خوشبختانه، AFM مبتنی بر منحنی نیرو می‌تواند نقشه نیروهای سطحی و مولکولی مختلف را از مقیاس میکرو تا نانومتر برای سیستم‌های زیستی، پیچیده و غیرهمگن، تهیه کند. حال می‌توان قدرت پیوندهای شیمیایی و همچنین پاسخ مکانیکی مواد زیستی مختلف را اندازه‌گیری کرد. گرچه پیشرفت فناوری به‌طور قابل توجهی زمان به‌دست آوردن تصویر AFM مبتنی بر منحنی نیرو را کاهش داده است با این حال، چالش مهمی برای تهیه تصویر در فرایندهای پیچیده و چند عاملی به حساب می‌آید.

### تهیه تصویر تشخیص مولکولی

بالفاصله بعد از معرفی تهیه تصویر مبتنی بر منحنی نیرو، ایده تهیه تصویر از خواص زیستی و شیمیایی به‌وجود آمد. این رویکرد نیازمند ایجاد برهم‌کنش‌های هدفدار بین سوزن و نمونه است که به کمک سوزن‌های عامل‌دار شده با گروه‌های شیمیایی معین یا لیگاند‌های خاص تسهیل شده‌است. منحنی‌های FD امکان اندازه‌گیری نیروهای چسبندگی و مکانیکی که بین سوزن و نمونه به‌وجود آمده را فراهم می‌کند. سوزن‌های شیمیایی می‌توانند با عامل‌دار کردن سوزن‌های پوشش داده شده با طلا با استفاده از تک لایه خودآرای<sup>۲۵</sup> آلکانوتیول با گروه‌های عاملی انتهایی نیترویلتری استات<sup>۲۶</sup> که قابل اتصال به مولکول‌های زیستی متصل به هیستیدین<sup>۲۷</sup> هستند، تجهیز شوند [۱۴]. همچنین سوزن‌های سیلیکونی را می‌توان آمینوسیلانیزه کرد و از واکنش با اتصال

سلولی غیرسرطانی و بافت سینه نشان داد که آن‌ها در مقایسه با سلول‌های سرطانی و بافت‌های بیمار سینه کمتر قابل تغییر هستند [۱۱]. بررسی‌ها نشان دادند که سیستم ای سلولی بیمار، خواص مکانیکی تغییر یافته قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهند.



شکل ۳: AFM مبتنی بر منحنی نیرو. الف- مبانی ثبت منحنی‌های نیرو - فاصله به واسطه نزدیک شدن (آبی رنگ) و دور شدن (قرمز رنگ) سوزن از نمونه. در حالت‌های ۱ تا ۵ بطوری که سوزن ابتدا در محلی دور از نمونه قرار دارد، سپس نزدیک سطح نمونه آورده می‌شود و پس از اعمال نیروی معین، از سطح جدا می‌شود. ب- تهیه تصویر AFM مبتنی بر منحنی نیرو - فاصله به صورت پیکسل به پیکسل، منحنی‌های نیرو - فاصله در حین رویش سطح نمونه ثبت می‌شود. نیروی Fi کنترل شده و متغیرها از قبیل نیروی چسبندگی سوزن - نمونه (Fadh) و یا خواص کشسانی و خواص الکترواستاتیک (با بهینه کردن منحنی) استخراج می‌شوند. متغیرها می‌توانند به صورت یک نقشه رنگی نمایش داده شوند و یا با توپوگرافی همبسته شوند. ج- نمونه‌ای از تهیه تصویر AFM چند متغیره مبتنی بر منحنی نیرو از لحظه تقسیم سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس و تصاویری از متغیرهای کشسانی و چسبندگی. د- نقشه ای خطای نیرو<sup>۲۴</sup> (بالا) و کشسانی (پایین) از کراتینوسیت HaCaT به صورت زنده. ه- توپوگرافی (سمت چپ، قهوه‌ای رنگ) و نقشه سختی (سمت راست بالا) تصویر منافذ غشا هسته سلول را از سطح سیتوپلاسم نشان می‌دهد. نمودار (سمت چپ پایین) سختی را به‌عنوان تابعی از فاصله سوزن - نمونه نمایش می‌دهد که تا نزدیکی مرکز حلقه سیتوپلاسمی ثبت شده‌است. نقاط خاکستری نماینده اطلاعات هستند و منحنی قرمز میانگین آنهاست. خط چین‌های آبی و مشکی با در نظر گرفتن سوزن‌های با نوک کرومی و مخروطی (به ترتیب) مدل‌سازی شده‌اند. ی- بالا سمت چپ: توپوگرافی از گیرنده‌های فعال شده پروتئاز انسانی ۱ (PAR1) در پروتئولیزوم که با سوزن مل‌دار شده با لیگاند SFLLRN ثبت شده‌است. پایین چپ: روی هم قرار دادن تصاویر توپوگرافی (خاکستری) و فعل و انفعالات چسبندگی (قرمز) که ناشی از اتصال موضعی لیگاند و گیرنده است. دایره‌هایی که از یک تا چهار شماره‌گذاری شده‌اند مناطقی را نشان می‌دهند که در آنها منحنی FD گرفته شده‌است. بالا راست: منحنی‌های FD چهار نقطه را نشان می‌دهد که چسبندگی نامشخص در مناطق ۱ و ۲، و چسبندگی ویژه در نقاط ۳ و ۴ ناشی از جدایی پیوند لیگاند - گیرنده است. پایین راست: نمای انرژی آزاد از وابستگی لیگاند پیوندی به PAR1. استخراج شده از اندازه‌گیری میزان گسستگی نیروی لیگاند - گیرنده در بارگذاری‌های متفاوت. Xu فاصله بین انتقال از حالت پیوندی به غیرپیوندی است و AGbu مقدار انرژی آزاد پیوند است [۱].

وضوح جانبی و وضوح زمانی، دو مبحثی هستند که در AFM مبتنی بر منحنی نیرو به هم وابسته هستند. در AFM‌های مدرن، وضوح جانبی به شعاع نوک سوزن، جابجایی حرکت سوزن یا

با دامنه ارتعاش بسیار کوچک (۵-۱۰ nm) برای روبش سطح نمونه و تشخیص پیوندهای خاص از طریق تغییر در دامنه است. در این روش<sup>۳۳</sup>، تصاویر توپوگرافی و تشخیصی با سرعتی مشابه حالت کاری تماسی AFM تشکیل می‌شوند [۲۱]. این روش برای تهیه نقشه محل اتصال کادهرین‌ها در لایه درون رگی استفاده شده است. با این وجود، به دلیل اینکه منحنی‌های FD ثبت می‌شوند، استخراج اطلاعات کمی با نقص همراه است.

### تهیه تصویر چند فرکانسی

در کنار تهیه تصویر توپوگرافی، AFM می‌تواند نقشه‌ای از مشخصه ای مکانیکی و عملکردی نمونه‌های زیستی را تهیه کند. با وجودی که، بکارگیری حالت‌هایی مانند AFM مبتنی بر منحنی نیرو نیز به‌طور قابل توجهی زمان کسب اطلاعات را افزایش می‌دهد، حالت ی پیشرفته دینامیکی AFM، شامل مدولاسیون فرکانس یا دامنه یا حالت چند فرکانسی، سرعت بالاتری را ارائه می‌دهد. اخیراً، حالت‌های چند فرکانسی پیشرفته امکان مطالعه بسیار جالبی از سیستم‌های زیستی را فراهم می‌کنند. AFM چند فرکانسی شامل تهییج هم‌زمان و یا آشکارسازی چندین فرکانس در ارتعاش تیرک است. این فرکانس‌ها معمولاً چندین هارمونی از فرکانس اصلی یا فرکانس رزونانس ذاتی تیرک را شامل می‌شوند [۲۲]. چندین رویکرد برای استفاده از AFM چند فرکانسی وجود دارد، با این حال مبانی فیزیکی آنها پیچیده است و اغلب توصیف تئوری آن‌ها در حال توسعه است. یک نکته مهم، توسعه اصطلاحات آنالیزی است که عواملی مانند دامنه، فاز، جابجایی فرکانس و غیره را به مشخصه ای ماده مانند توپوگرافی، انعطاف‌پذیری، چسبندگی، سختی، الکترواستاتیک و یا مغناطیس مرتبط می‌کند. چگونگی عملکرد این روش، براساس تهییج دو فرکانس در تیرک AFM است (شکل‌های (۴-الف) و (۴-ب)).

AFM دو حالت<sup>۳۴</sup> برای ثبت توپوگرافی و نقشه انعطاف‌پذیری آنتی‌بادی‌های تکی IgM (نوعی از ایمونوگلوبولین) با وضوح فضایی ۲ نانومتر مورد استفاده قرار گرفته است و نشان داده شده که بالاترین قسمت پروتئین دارای مدول یانگ ۱۸ مگاپاسکال است، در حالی که قسمت ی متصل به آنتی‌ژن بسیار نرم‌تر (۸ Pa) است [۲۲].

AFM دو حالت هم‌چنین برای تهیه تصویر فریتین<sup>۳۵</sup> به کمک نیروهای مکانیکی کوتاه‌برد (۵-۱۰/۵ nm) و همچنین نیروهای مغناطیسی بلندبرد (۵-۱۰۰۰ nm) به‌طور جداگانه استفاده شده است. جداسازی نیروهای مکانیکی از مغناطیسی در فریتین امکان‌پذیر است، زیرا اولین فرکانس به نیروهای کوتاه‌برد و دومین فرکانس به نیروهای بلندبرد حساس است [۲۳] (شکل (۴-ج)). تهیه تصویر از لایه‌های آبی احاطه‌کننده شپرون در نیروهای  $< 20 \text{ pN}$ ، پتانسیل AFM دو حالت را برای درک نوینی از خواص نمونه نشان می‌دهد [۲۴] (شکل (۴-د)). در تکمیل این کاربردها، AFM هم‌چنین برای تهیه تصویر لایه‌های آبدار در فصل مشترک آب - چربی غشاهای لیپیدی بکار رفته است.

دهنده‌های پلی‌اتیلن گلیکول که گروه‌های بنزآلدئید دارند، به پپتیدها یا پروتئین‌ها از طریق لیزین<sup>۳۸</sup> متصل نمود [۱۵].

با پروب‌های عامل‌دار شده، AFM مبتنی بر منحنی نیرو می‌تواند برهم‌کنش‌های خاص را آشکارسازی کرده و موقعیت آن در سیستم‌های زیستی از آنتی‌بادی تا سلول‌های زنده انسانی را مشخص کند.

AFM مبتنی بر منحنی نیرو برای تهیه نقشه محل پذیرنده<sup>۳۹</sup> در سلول‌های حیوانی مفید هستند [۱۶]. امروزه نقشه گیرنده‌های سلول‌های حیوانی شامل گیرنده‌های ویترونکتین<sup>۳۰</sup> در استئوبلاست، گیرنده‌های پروستاگلاندین<sup>۳۱</sup> در سلول‌های تخمدان همستر چینی و پروتئین‌های گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول<sup>۳۲</sup> در اعضای عصبی تهیه شده‌اند. در مثالی دیگر، تصویر پیوندهای تکی میان گیرنده و پذیرنده در گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G انسان در غشاء یه و اندازه‌گیری شده‌اند. با حرکت دادن سوزن AFM به‌صورت غیرخطی، نیروهای غیرپیوندی گاندها می‌توانند در محدوده وسیعی اندازه‌گیری شوند که باعث ایجاد نقشه انرژی آزاد پیوند لیگاند - گیرنده می‌شود (شکل (۳-ی)). با به کار بردن این فناوری در باکتری‌ها و مخمرها، می‌توان اجزای اصلی دیواره سلولی شامل پپتیدوگلیکان‌ها [۱۷]، تیکوئیک اسید [۱۸] و پروئین‌های چسبنده سطح [۱۹] را آشکارسازی نمود. این مطالعات، توزیع ناهمگن مولکول‌های سطح میکروپ که به وضعیت سلول وابسته است را آشکار کرد. تاکنون AFM با سوزن عامل‌دار شده برای نوعی از مولکول‌های زیستی استفاده شده است، اما در رویکردهای اخیر، امکان استفاده از سوزن‌های با دو لیگاند متفاوت برای نقشه‌برداری دو سایت ترکیبی از گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G انسان انجام شده است [۲۰]. چنین کاربردهایی درها را بسوی تهیه تصویر تشخیصی چند منظوره مبتنی بر AFM باز می‌کند.

یک مسئله مهم هنگام آنالیز نیروهای چسبنده آشکار شده با AFM مبتنی بر منحنی نیرو، اثبات مختص بودن آن‌ها و تفکیک آن‌ها از نیروهای دیگر است. کنترل‌ها شامل مسدود کردن برهم‌کنش‌های مخصوص با آنتی‌بادی‌ها یا ترکیب‌های شیمیایی و یا استفاده از سلول‌های جهش یافته دارای کمبود سایت ای تشخیصی مخصوص است. برای مقایسه مستقیم، می‌توان نمونه‌های نشان‌دار شده فلورسنت را با سلول‌های جهش یافته به‌صورت مشترک کشت داد و تصویر آنها را با میکروسکوپ فلورسنت و به‌طور هم‌زمان به کمک سوزن‌های عامل‌دار شده یه کرد. مسئله آلوده شدن سوزن مورد دیگری است که باید توجه لازم به آن صورت گیرد. در مواجهه با سلول‌های زنده، مولکول‌هایی که با پیوندهای ضعیف جذب سطحی می‌شوند امکان تغییر گروه ی عاملی سوزن را دارند که منجر به اندازه‌گیری برهم‌کنش‌های غلط سوزن و نمونه می‌شود. بنابراین، قبل از جذب شدن این مولکول‌ها به سوزن عامل‌دار، تهیه تصویر از نمونه با سوزن خام می‌تواند مفید باشد. هم‌چنین نیروهای درگیر باید کمتر از ۱۰۰ pN باشد. روشی جایگزین برای AFM مبتنی بر منحنی نیرو، استفاده از سوزن عامل‌دار شده مرتعش

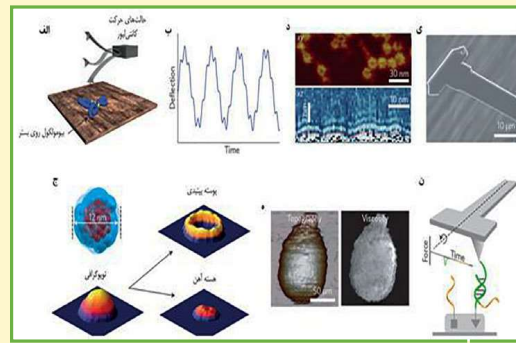


یکسَل می‌تواند توپوگرافی و نقشه ساختارهای زیرین سطح را فراهم کند [۲۷]. این روش امکان تهیه تصویر زیر سطح پنهان شده یا دفع شده سلول‌های حیوانات و گیاهان را فراهم می‌کند. گر چه در حال حاضر تهیه تصویر زیرسطحی نیاز به استفاده از نیروهای نسبتاً بزرگ (۱۰۰ nm) را دارد، این سوال را ایجاد می‌کند که تا چه حد ساختارهای تهیه تصویر شده بیانگر سلول‌های دست نخورده اصلی هستند. بعلاوه استفاده از امواج فراصوت برای تولید تصاویر از ساختارهای زیر سطح، چالش‌های تفسیری و محدودی‌ای وضوح فضایی را باقی می‌گذارد. بنابراین، قبل از حالت تهیه تصویر AFM و استفاده آن برای طیف مخاطبان برای مسائل مهم زیستی، نیاز به پیشرفت‌های دستگاهی و تئوری است.

### تهیه تصویر با سرعت بالا در فرایندهای زیستی

در مقایسه با میکروسکوپ فلورسنت، تهیه تصویر AFM کند محسوب می‌شود. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های وسیع فناوری امکان افزایش سرعت تهیه تصویر را فراهم آورده و جایی برای مطالعه فرایندهای مولکولی دینامیکی به وسیله AFM با سرعت بالا یا HS-AFM<sup>۳۷</sup> باز کرده است (شکل ۵).

در بین اجزای AFM، تیرک به دلیل حرکت مکانیکی دارای سرعت حرکت آتری نسبت به دیگر اعضا است. بنابراین، برای رسیدن به سرعت بالا با استفاده از مدولاسیون دامنه، زمان پاسخگویی تیرک که برابر است با  $\tau = (Q/\pi f_0)$  باید کوتاه شود، که در آن:  $Q$  عامل کیفیت و  $f_0$  اولین فرکانس رزونانس تیرک در آب است (شکل ۵-ب). برای افزایش  $f_0$  در حین محفوظ داشتن ثابت  $k$  به مقدار کوچک، تیرک‌های کوچک (۹-۱۴ میکرون طول، ۵-۲ میکرون عرض و ۱۰۰-۱۴۰ نانومتر ضخامت) توسعه یافتند به طوری که  $f_0 = 100-150$  kHz و  $k = 0.1-0.3$  N/m شد. از آنجا که مقدار  $Q$  این تیرک‌ها مقدار ۲- در آب است، زمان پاسخگویی آنها  $1-6$   $\mu$ s (بین ۲۴۰-۴۰ برابر) کوتاه‌تر از تیرک‌های معمول در آب است. در حالی که تیرک‌های کوچک دارای  $f_0 = 400-800$  kHz و  $k = 0.1-0.2$  N/m به طور تجاری در دسترس هستند. برای حصول HS-AFM محدود کردن ارتعاش مکانیکی روبشگر در راستای  $Z$  که در فرکانس خیلی بالاتری از راستای  $X$  و  $Y$  حرکت می‌کند بسیار مهم است (شکل ۵-ج). برای این منظور، ۳ رویکرد در نظر گرفته شده است: متعادل کردن سیگنال‌های تولید شده با جابجاگر روبشگر در راستای  $Z$ ، طراحی روبشگر سخت و قدرتمند و تعدیل دائم ارتعاش مبتنی بر روش کنترل  $Q$  (شکل ۵-د). آخرین بخش ذکر شده می‌تواند به‌طور دینامیکی بهره‌مدار بازخورد را در طول تهیه تصویر به‌منظور به حداقل رساندن نیروی سوزن - نمونه تنظیم کند (شکل ۵-ه) [۳۷]. در اوایل ظهور DNA، HS-AFM [۱۲]، سیستم‌های شیرون GroEL-GroES [۲۸] و میوزین V [۲۹] برای ارزیابی عملکرد قطعات توسعه یافته جدید مشاهده



شکل ۴: AFM چند فرکانسی. الف- نمایشی از انحراف تیرک در AFM دو حالت. ب- ارتعاش تیرک در طول زمان. ج- جداسازی نیروهای مکانیکی کوتاه‌برد و اثرات متقابل بلندبرد مغناطیسی در فریتین با ترکیب دو سیگنال هسته آهن و پوسته پیتیدی. د- تصویر بالا: توپوگرافی پروتئین شیرون<sup>۳۴</sup> (در صفحه XY) و تصویر پایین: پروفایل عمودی (صفحه XZ، از خط قرمز داخل توپوگرافی) از لایه‌های آبی احاطه‌کننده چهار پروتئین شیرون. ه- تصویر توپوگرافی و ویسکوزیته AFM چند فرکانسی از یک باکتریوفاج بالغ با نیروی ۱۰۰ pN. ی- تصویر میکروسکوپ الکترونی از یک تیرک T شکل که برای AFM هارمونیک پیشگی طراحی شده است. ن- طرح هارمونیک‌های پیشگی چند فرکانسی برای بررسی گروه‌های شیمیایی یک پروتئین با استفاده از برجسب‌های DNA. نشان داده شده است. یک رشته DNA که به نوک متصل است با رشته‌های DNA هدف مکمل است. رشته‌های مکمل رنگ‌های یکسان دارند [۱].

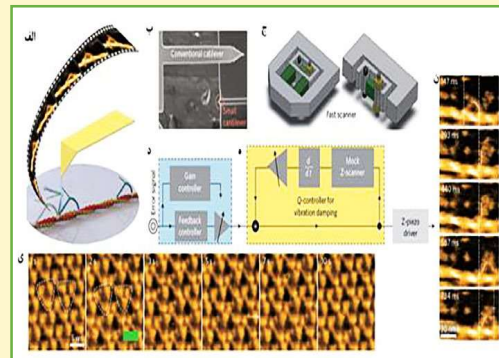
در AFM چند هارمونی، تیرک با یک فرکانس تحریک می‌شود. در حالی که چندین هارمونی شاری یا پیشگی را ثبت می‌کند. در ابتدا، این حالت تهیه تصویر AFM برای اندازه‌گیری توپوگرافی و خواص ویسکوا یک نمونه‌های زیستی بزرگ شامل ویروس‌ها و سلول‌ها به‌کار گرفته شدند [۲۵] (شکل ۴-ه). هارمونی‌های پیشگی امکان ثبت توپوگرافی نمونه و نیروهای متغیر با زمان نمونه را با تصحیح هارمونی‌های بالاتر از حرکت پیشگی فراهم می‌کند. کمیت این نیروها، خواص مکانیکی نمونه شامل مدول یانگ یا چسبندگی را مشخص می‌کند. همچنین هارمونی‌های پیشگی، واکنش‌هایی در حد میکروثانیه را با اندازه‌گیری نیروهای بین گروه‌های شیمیایی یا پروتئین‌ها آشکار می‌کند [۲۶] (شکل‌های ۴-ی) و (۴-ن). با این حال AFM چند هارمونی، نیاز به استفاده از تیرک T شکل دارد که تاکنون تجاری‌سازی نشده است. این مورد، همراه با نیاز استفاده از الگوریتم‌های پیچیده برای آنالیز هارمونی و اطلاعات آن، در حال حاضر باعث محدود شدن استفاده از این روش شده است. دسترسی به ساختار زیر سطحی سیستم‌های پیچیده زیستی چالشی بلند مدت برای AFM بوده است. اخیراً میکروسکوپ الکترونیکی و AFM دینامیکی برای تحریک و تهیه مکانیکی نمونه و تیرک ترکیب شده‌اند که موج‌های مکانیکی تولید شده با امواج فراصوت در سطح نمونه توزیع می‌شود و برهم‌کنش‌های مکانیکی امواج داخل نمونه باعث تغییر دامنه و فاز می‌شود؛ بنابراین، استفاده از سوزن AFM برای نمایش این تغییرات به‌صورت پیکسل به

نمونه میکروسکوپ متکی بوده است که باعث ترکیب دشوار آن با میکروسکوپ‌های نوری شده‌است. امروزه HS-AFM پیشرفت فراوانی کرده است بطوری که امکان مطالعه سلول‌های زنده کشت شده درون پتری دیش، پروتئین‌های معلق درون غشاء و حتی اندازه‌گیری پاسخ پروتئین‌ها به نیروهای خار مانند پنس‌های نوری امکان‌پذیر شده‌است. کاربردهای سلولی این روش، بیشتر نیازمند ترکیب روش AFM و روش ای پیشرفته نوری است. همچنین امکان انتقال این فناوری به (HS-SICM) SICM برای مطالعه دینامیک سلول‌های زنده و ارگان ای بین‌سلولی امکان‌پذیر است.

### تهیه تصاویر همبسته

سلول‌های زنده پیچیدگی ساختاری و عملکردی بسیار بالایی دارند. سطوح سلولی شامل هزاران ماکرومولکول متفاوت است که باعث ایجاد ناهمگنی و دینامیک پیچیده در سطح سلول می‌شود. بنابراین، حتی شناسایی ساختارهای ساده سطح سلول مانند گیرنده‌ها، کانال‌ها، انتقال‌دهنده‌ها و غیره با توپوگرافی ثبت شده به کمک AFM دشوار است. در چنین مواردی ترکیب کامل روش‌های میکروسکوپی با AFM می‌تواند ساختارهای سلولی پیچیده را شناسایی کنند. این روش شامل میکروسکوپی نوری، میکروسکوپی فلورسنت، میکروسکوپی هم‌کانون یا کنفوکال<sup>۳۹</sup>، انتقال انرژی رزونانس فورستر<sup>۴۰</sup>، انعکاس کامل فلورسنت درونی و میکروسکوپی توان تفکیک بالا هستند. در بیشتر موارد AFM به جای یکی از لنزهای چشمی میکروسکوپ نوری سوار می‌شود. محفظه‌هایی وجود دارند که سیستم‌های سلولی را در حالت طبیعی خود می‌توانند نگهداری کنند (شکل ۶-الف)). امروزه تلفیق چند میکروسکوپی امکان مشخص کردن محدوده وسیعی از سیستم‌های زیستی از غشاء و سلول تا بافت را فراهم می‌سازد. یک تلفیق رایج AFM، همراه کردن آن با میکروسکوپ فلورسنت یا کنفوکال است. کاربرد این روش‌ها، استفاده در بررسی سلول‌های منفرد حیوانی تا بافت آنها و سلول‌های میکروبی است. در چنین مطالعاتی ساختارهای مورد نظر به شکل فلورسنت نشان‌گذاری می‌شوند و به‌صورت اپتیکی (با وضوح میکرومتری) تهیه تصویر شده و سپس توپوگرافی‌های AFM با دقت نانومتر ایجاد می‌شود. با استفاده از این رویکرد، اجتماعات درشت مولکول‌های سطح سلول شناسایی شده و باعث درک عملکرد آنها می‌شود. برای مثال، مراحل مختلف تعامل بین پاتوژن‌های قارچی و ماکروفاژها بررسی شد که شامل تماس اولیه سلولی، وارد شدن سلول‌های قارچ، سوراخ کردن عضو و گریز از ماکروفاژها بود. در حالی که تهیه تصویر فلورسنت باعث تمیز سلول‌های قارچی از ماکروفاژها می‌شود، AFM نانوساختارهای مرتبط در هر دو سلول را نمایان می‌کند (شکل‌های ۶-ب) و (۶-ج)) [۳۴]. همچنین AFM برای تهیه تصویر ساختار سطح سلول شامل میکروویلی<sup>۴۱</sup>، لبه‌های اکتین و حوزه‌های نانویی غشای سلولی و شناسایی مشخصه‌های مکانیکی - دینامیکی

شدند. اخیراً نیز HS-AFM کاربرد منحصربه‌فردی در تعیین عملکرد باکتری‌رودوپسین<sup>۳۸</sup>، میوزین V، F1، ATPase و ترکیب حفره‌های هسته ارائه کرده است. تصاویر باکتری‌رودوپسین که یک پمپ پروتون وابسته به نور (و مدل کامل و مناسبی برای مطالعه پروتئین‌های غشایی است) در شکل (۵-ی) [۳۰] نشان داده شده‌است که در زمان تابش نور، قسمت‌های ماریچی E و F از ساختار هر باکتری‌رودوپسین به اندازه  $\sim 0.7$  nm بسمت خارج ایجا می‌شوند و تریمرهای مجاور باکتری‌رودوپسین با هم تلاقی می‌کنند. میوزین V (که یک موتور مولکولی فعال در انتقالات درون سلولی است) در طی یک فرایند، روی رشته‌های اکتین حرکت می‌کند که با هیدرولیز هر ATP گامی به اندازه ۳۶ nm به جلو رانده می‌شود. نتایج HS-AFM تعامل میوزین و اکتین را به‌صورت مشاهده مستقیم فراهم کرده است و فرضیه حرکت میوزین بر بازوی اکتین که برای سال‌ها مطرح شده بود را مصور کرد [۳۱] (شکل (۵-ن)).



شکل ۵: فرایند فیلم‌برداری از پروتئین با HS-AFM. (الف) فیلم‌برداری از حرکت میوزین روی رشته‌های اکتین. (ب) تیرک‌های کوچک با فرکانس رزونانس بالا و ثابت فنر کم. (ج) روبشگر سریع که جایجایی‌های کوچک پیزوالکتریک را در راستاهای مختلف تامین می‌کند. (د) کنترلر مدار بازخورد با قابلیت تنظیم بهره برای تهیه تصویر با سرعت بالا. (ه) تعدیل‌کننده ارتعاش بر اساس کنترل Q. (ی) باکتری‌رودوپسین در غشای اصلی خود در تاریکی و نور با سرعت ۱ فریم در ثانیه. مثلث‌های سفید (سمت چپ) تریمرهای باکتری‌رودوپسین و مثلث‌های آبی (سمت راست) مونومرهای باکتری‌رودوپسین هستند که هر کدام متعلق به تریمر مجاورش است (منطقه سه‌گانه). نور سبز برای S2 روشن و S3 خاموش شده‌است. در زمان تابش نور، تریمرهای باکتری‌رودوپسین به بیرون کشیده می‌شوند در حالی که مونومرها در منطقه سه‌گانه با هم تلاقی می‌کنند. (ن) حرکت میوزین V در امتداد یک رشته اکتین، خطوط سفید نشان‌دهنده سرهای میوزین است [۱].

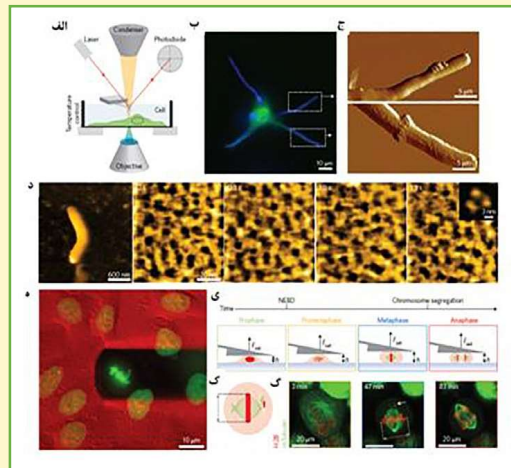
در کنار این مطالعات مولکولی، HS-AFM به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌منظور مشاهده فرایندهای دینامیکی باکتری‌های زنده [۳۲] و سلول‌های یوکاریوت [۳۳] به‌کار برده شده‌است. HS-AFM برای مدت طولانی برای روبش نمونه‌ها روی میز نگهدارنده



## نتیجه‌گیری

یکی از مزایای گسترده استفاده از AFM، فراهم آوردن مشخصه‌های چندعملکردی و چند عاملی سیستم‌های زیستی است. این روش‌ها شامل تهیه تصویر با وضوح بالا از ساختارهای زیستی و نقشه هم‌زمان خواص مکانیکی، سینتیکی و ترمودینامیکی گروه‌های عاملی، سایه‌های پیوندی، انرژی آزاد پیوند لیگاند - گیرنده همچنین تعیین مشخصه‌های الکترواستاتیکی از توزیع بار تا جریان یونی است. در سال‌های اخیر، بسیاری از حالت‌های کاری جدید AFM توسعه یافته است که توانسته در سیستم‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرد و اطلاعات مختلف کمی و نقشه‌های ساختاری را از سیستم‌های پیچیده زیستی استخراج کند. در حال حاضر، حساسیت نیرو و پایداری دمایی AFM باعث محدود شدن دقت آن در شناسایی سیستم‌های زیستی شده است؛ بنابراین، اخیراً AFM‌های فرایپایدار معرفی شده‌اند که دقت نیروی زیر پیکونیوتن، پایداری موقعیتی بسیار بالا  $< 0.03 \text{ \AA}$  و خزش جانبی بسیار کم ( $\sim 15\text{-pm min}$ ) را فراهم می‌کنند و می‌توانند مبنای کاربردهای جدید در پدیده‌های زیستی باشند. امروزه بیشتر کاربران Bio-AFM تنها از یک حالت کاری تهیه تصویر AFM برای زمینه تخصصی خود استفاده می‌کنند. با این حال، سیستم‌های زیستی پیچیده هستند و نیاز است تا محدوده وسیعی از اطلاعات جمع‌آوری شود. بنابراین ما انتظار داریم که بسیاری از روش‌های AFM بحث شده در این مقاله بزودی در یک ابزار واحد ترکیب شوند و در نتیجه به صورت یک مجموعه اندازه‌گیری ارائه شوند. چنین دستگاه چند منظوره، چند عاملی، چند فرکانسی همراه با سرعت بالا، منجر به درک کامل‌تری از فرایندهای دینامیکی، ساختاری، مکانیکی، شیمیایی و عملکردی سیستم‌های زیستی پیچیده می‌شود و سوالات مهمی را در زیست‌شناسی در سال‌های آینده پاسخگو خواهد بود.

استفاده می‌شود [۳۵] (شکل ۶-۵)؛ میکروسکوپی نوری بیشتر برای ریخت‌شناسی و حالت سلول به کار می‌رود. در حالی که AFM برای ثبت مشخصه‌های مکانیکی (سختی، کشسانی، فشار) سلول یا برهم‌کنش‌های مکانیکی آن با محیط (مهاجرت، چسبندگی) به کار می‌رود. چنین آزمایش‌هایی مشاهده انقباض شدید هنگام تقسیم سلولی را امکان‌پذیر کرده است.



شکل ۶: تصاویر AFM از سیستم‌های سلولی. الف- نمای AFM جفت شده با میکروسکوپ نوری برای شناسایی سلول‌های زنده. ب- تصویر فلورسانس از ماکروفاژ (سبز) انکوبه شده با کاندیدا آلیکنس ۴۲ (آبی). ج- تصاویر AFM از قسمت‌های بالایی و پایینی که دارای تفاوت ساختاری عمده هستند. د- تصاویر توپوگرافی با HS-AFM از باکتری اشرشیاکلی، تصویر اول کل باکتری و تصاویر بعدی غشای خارجی را که ساختار شبکه مانند به خود گرفته‌اند را نشان می‌دهد. تصویر درج شده در آخرین تصویر، پروتئین تریمر پورین است. ه- محفظه مکانیکی و مورفولوژیکی سلول‌های حیوانی در حال تقسیم میتوز، تمایز کنتراست فلورسانس با GFP (H2B) در سلول HeLa و تیرک (سایه تاریک) در حال اندازه‌گیری نیرو و فشار تک‌سلول در دوره متافاز از تقسیم است. ی- تیرک گوه‌ای برای محدود کردن سلول HeLa و کنترل پیشرفت مکانیکی تقسیم میتوز به کار رفته است و مراحل میتوزی به تصویر کشیده شده است. ک- نمای سلول HeLa در حال تقسیم. گ- تصاویر فلورسانس از مراحل مختلف، فلش خاکستری پهنای صفحه متافاز را نشان می‌دهد [۱۷].

ترکیب AFM با میکروسکوپ هم‌کانون برای کنترل سلول ای یوکاریوتی که بیان پروتئین GFP-اکتین، توبولین، ویمنتین و لامین A را دارند به منظور تهیه تصویر از خواص مکانیکی سیتواسکلت و هسته‌ها بکار گرفته شده است [۳۶]. AFM همچنین برای ارزیابی کمی فشار سلولی و تنش قشری بکار گرفته شده است (شکل‌های ۶-۵ تا ۶-۶). این رویکرد به فهم چگونگی تنظیم و تغییر شکل سلول‌های حیوانی هنگام فرایند میتوز کمک شایانی کرده است. همان‌طور که در بالا توضیح داده شد، تیرک‌ها می‌توانند با مولکول‌های زیستی، گروه‌های شیمیایی و یا حتی سلول‌های زنده عامل‌دار شوند و برهم‌کنش‌های خاص آنها ثبت شود. چنین تهیه تصویری با استفاده از میکروسکوپ اپتیکی می‌تواند تصویری جامع از توزیع گیرنده‌های سطح سلول و ریخت‌شناسی و حالات سلولی را آشکار سازد.

## پی‌نوشت

22. Circular plasmid DNA
23. Force distance curve (FD)
24. Force error
25. Self-assemble monolayer
26. Nitrotriacetate
27. Histidine
28. Lysine
29. Receptor
30. Vitronectin
31. Prostaglandin
32. Glycosylphosphatidylinositol
33. Topography and recognition imaging (TREC)
34. Bimodal AFM
35. Ferritin
36. Chaperone یا شپرون به پروتئین‌هایی گفته می‌شود که کارشان کمک به تاشدگی کوالانسی یا باز شدن ساختارهای ابرمولکولی است.
37. High speed AFM
38. Bacteriorhodopsin
39. Confocal microscopy
40. Förster resonance energy transfer
41. Micrivilli
42. Candida albicans
۱. کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲. کارشناسی ارشد زمین‌شناسی، پارک علم و فناوری همدان
۳. کارشناسی ارشد فیزیک حالت جامد، دانشگاه بیرجند
۴. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ پروبی روبشی، شبکه آزمایشگاهی
5. Atomic Force Microscopy (AFM)
6. Noise
7. Dynamic mode AFM (DM-AFM)
8. Force-distance curve-based AFM (FD-AFM)
9. Multiparametric AFM (MP-AFM)
10. Molecular recognition AFM (MR-AFM)
11. Multifrequency AFM (MF-AFM)
12. High-speed AFM (HS-AFM)
13. Super resolution microscopy
14. Cryo-electron microscopy
15. Stimulated emission depletion
16. Photoactivated localization microscopy
17. Stochastic optical reconstruction microscopy
18. Transmission electron microscopy (TEM)
19. Scanning electron microscopy (SEM)
20. Scanning ion conductance microscopy (SICM)
21. Brome mosaic viruses

## مرجع

- [1] Dufrêne Y., Ando T., Garcia R., Alsteens D., Martinez D., Engel A., Gerber C. and J. Müller. D, Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology, NATURE NANOTECHNOLOGY, 6 (295-307) 2017.
- [2] Schabert, F. A., Henn, C. & Engel, A. Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. Science 268, 92–94 (1995).
- [3] Engel, A. & Muller, D. J. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. Nat. Struct. Biol. 7, 715–718 (2000).
- [4] Garcia, R. & Herruzo, E. T. The emergence of multifrequency force microscopy. Nat. Nanotech. 7, 217–226 (2012).
- [5] Muller, D. J. & Dufrene, Y. F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. Trends Cell Biol. 21, 461–469 (2011).
- [6] Kasas, S. & Ikai, A. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. Biophys. J. 68, 1678–1680 (1995).
- [7] Hansma, P. K., Drake, B., Marti, O., Gould, S. A. & Prater, C. B. The scanning ion-conductance microscope. Science 243, 641–643 (1989).
- [8] Oesterhelt, F. et al. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. Science 288, 143–146 (2000).
- [9] Rotsch, C. & Radmacher, M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. Biophys. J. 78, 520–535 (2000)
- [10] Matzke, R., Jacobson, K. & Radmacher, M. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. Nat. Cell Biol. 3, 607–610 (2001)
- [11] Plodinec, M. et al. The nanomechanical signature of breast cancer. Nat. Nanotech. 7, 757–765 (2012).

- [12] Viani, M. B. et al. Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *J. Appl. Phys.* 86, 2258–2262 (1999).
- [13] Dufrene, Y. F., Martinez-Martin, D., Medalsy, I., Alsteens, D. & Muller, D. J. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat. Methods* 10, 847–854 (2013).
- [14] Kienberger, F. et al. Recognition force spectroscopy studies of the NTA-His6 bond. *Single Mol.* 1, 59–65 (2010).
- [15] Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schilcher, K. & Schindler, H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 3477–3481 (1996).
- [16] Grandbois, M., Dettmann, W., Benoit, M. & Gaub, H. E. Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 719–724 (2000).
- [17] Andre, G. et al. Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nat. Commun.* 1, 27 (2010).
- [18] Andre, G. et al. Fluorescence and atomic force microscopy imaging of wall teichoic acids in *Lactobacillus plantarum*. *ACS Chem. Biol.* 6, 366–376 (2011).
- [19] Alsteens, D., Garcia, M. C., Lipke, P. N. & Dufrene, Y. F. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 20744–20749 (2010).
- [20] Pfrundschuh, M. et al. Identifying and quantifying two ligand-binding sites while imaging native human membrane receptors by AFM. *Nat. Commun.* 6, 8857 (2015).
- [21] Raab, A. et al. Antibody recognition imaging by force microscopy. *Nat. Biotechnol.* 17, 901–905 (1999).
- [22] Garcia, R. & Herruzo, E. T. The emergence of multifrequency force microscopy. *Nat. Nanotech.* 7, 217–226 (2012).
- [23] Dietz, C., Herruzo, E. T., Lozano, J. R. & Garcia, R. Nanomechanical coupling enables detection and imaging of 5 nm superparamagnetic particles in liquid. *Nanotechnology* 22, 125708 (2011).
- [24] Herruzo, E. T., Asakawa, H., Fukuma, T. & Garcia, R. Three-dimensional quantitative force maps in liquid with 10 piconewton, angstrom and sub-minute resolutions. *Nanoscale* 5, 2678–2685 (2013).
- [25] Cartagena, A., Hernando-Perez, M., Carrascosa, J. L., de Pablo, P. J. & Raman, A. Mapping in vitro local material properties of intact and disrupted virions at high resolution using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nanoscale* 5, 4729–4736 (2013).
- [26] Kim, D. & Sahin, O. Imaging and three-dimensional reconstruction of chemical groups inside a protein complex using atomic force microscopy. *Nat. Nanotech.* 10, 264–269 (2015).
- [27] Shekhawat, G. S. & Dravid, V. P. Nanoscale imaging of buried structures via scanning near-field ultrasound holography. *Science* 310, 89–92 (2005).
- [28] Viani, M. B. et al. Probing protein-protein interactions in real time. *Nat. Struct. Biol.* 7, 644–647 (2000).
- [29] Ando, T. et al. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *ChemPhysChem* 4, 1196–1202 (2003).
- [30] Shibata, M., Yamashita, H., Uchihashi, T., Kandori, H. & Ando, T. High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin. *Nat. Nanotech.* 5, 208–212 (2010).
- [31] Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R. & Ando, T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468, 72–76 (2010).
- [32] Fantner, G. E., Barbero, R. J., Gray, D. S. & Belcher, A. M. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nat. Nanotech.* 5, 280–285 (2010).
- [33] Shibata, M., Uchihashi, T., Ando, T. & Yasuda, R. Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells. *Sci. Rep.* 5, 8724 (2015).
- [34] El-Kirat-Chatel, S. & Dufrene, Y. F. Nanoscale imaging of the *Candida* — macrophage interaction using correlated fluorescence-atomic force microscopy. *ACS Nano* 6, 10792–10799 (2012).
- [35] Roduit, C. et al. Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys. J.* 94, 1521–1532 (2008).
- [36] Pelling, A. E., Veraitch, F. S., Chu, C. P., Mason, C. & Horton, M. A. Mechanical dynamics of single cells during early apoptosis. *Cell Motil. Cytoskel.* 66, 409–422 (2009).
- [37] Ando, T., Uchihashi, T. & Kodera, N. High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Ann. Rev. Biophys.* 42, 393–414 (2013).