

A nanofluidikai atomerőmikroszkóp: FluidFM

Nagy Ágoston Gábor^{1),2)}, Bonyár Attila²⁾, Horváth Róbert¹⁾

¹⁾ MTA EK MFA Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport
1121 Budapest, Konkoly-Thege M. út 29-33, 26. épület 2. emelet 205

²⁾ Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Elektronikai Technológia Tanszék, 1111 Budapest, Egry József u. 18.
E-mail: ag.nagy@ett.bme.hu

Tartalmi kivonat. A FluidFM technológiája kombinálja a hagyományos atomerő mikroszkópot nanofluidikai csatornákkal és egy nyomásszabályozó eszköz rendszerével, mely fejlesztéssel a műszer átlép olyan mérés-technikai korlátokat, amelyek korábban csak magas technikai tudással és jelentős időráfordítással voltak elérhetőek. A FluidFM berendezés által lehetővé válik nanotechnológiai és elő-sejtes rendszerek interdiszciplináris vizsgálata, ami által betekintést nyerhetünk olyan elemi részletekbe, mint például a sejtdhézió vagy pedig a nanostruktúrák hatásai az élő rendszerekre.

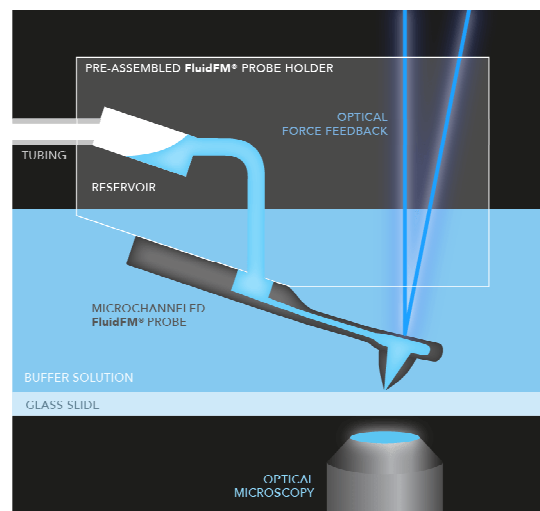
Kulcsszavak: FluidFM; atomerő mikroszkóp; nanofluidika; szilícium technológia; nanolitográfia

1. A FLUIDFM TÖRTÉNETE

A nanofluidikai atomerő-mikroszkóp technológiáját először 2009-ben írták le részletesen [1]. A nanofluidikával ellátott atomerő-mikroszkóp kutatása és technikai hátterének kidolgozása a 2000-es évek elején indult, azonban az eszköz kereskedelmi forgalomba hozatalában és fejlesztésében nagy szerepet játszott a Cytosurge AG, mely cég a zürichi technológiai főiskola (ETH Zürich) spin-off cége. A „fluidic force microscope”, avagy rövidebben FluidFM kombinálja a hagyományos atomerő mikroszkópot (atomic force microscope, AFM) nanofluidikai csatornákkal szabályozott rendszerével [1]. Az AFM technológiájának kidolgozásáért 1986-ban ítéltek oda a fizikai Nobel-díjat, és a műszer azóta is széleskörű népszerűségnek örvend, mivel nagy (akár atomi) felbontású képalkotást tesz lehetővé. Alkalmazása kiterjed az anyagtudományra, a műszaki tudományokra és az élettudományok számos területére is. Manapság számos alap és alkalmazott kutatási irányban az AFM rutinberendezésnek számít, amellyel felületi topográfiát és felületi fizikai kölcsönhatásokat (elektrosztatikus erő, mágneses erő, vezetőképesség-térképek, mechanikai tulajdonságok, stb.) lehet precízen leképezni, akár egyedi atom felbontással.

Az AFM talán legfontosabb része egy piezoelektromosan mozgatott, ismert geometriájú és igen hegyes tű (görbületi sugara ma már akár 10 nm alatti), amely a vizsgálni kívánt felszín pászttázza

végig. Technikailag ez a tű egy ismert rugóállanddal rendelkező tartókonzolla, ún. rugólapkára van erősítve és így közösen alkotják a szondát. A rugólapkára irányított fókuszált lézerefény visszaverődésének valamint kitérésének detektálása teszi lehetővé a szondát érő erőhatások precíz leképezését. Topográfiai leképezéseknél a tű és felület között fellépő atomi vonzó és taszító kölcsönhatások játszanak szerepet, melyek a rugólapka elhajlását és így a visszaverődött lézerefény kitérését okozzák, melyet egy fotodetektorokból álló elrendezés érzékel [2]. Ennek köszönhetően tud az AFM mechanikai kölcsönhatásokat is kimérni, mert ha meghajlik a rugólapka, akkor a lézerefény arányos kitérése adja a számunkra értelmezhető fizikai paramétert.



1. ábra. A FluidFM kombinálja az AFM technológiáját nanofluidikai csatornákkal. A mérőszonda képes piko-Newtonos erőhatások kimérésére [3]

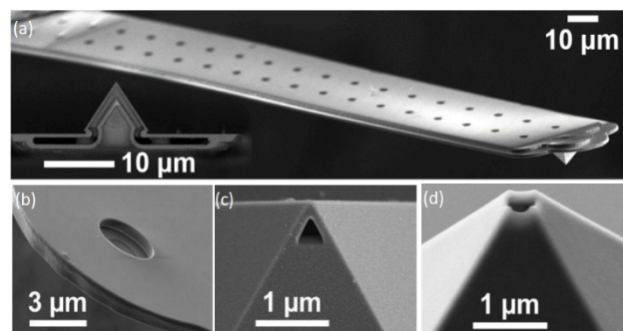
A FluidFM lényegében egy AFM berendezés, melynek pásztázó fejébe bevezettek egy nanofluidikai csatornát, amit összekapcsoltak egy nyomásszabályozó rendszerrel, így képesek vagyunk -800 és 1000 mBar között szabályozni a csatornában lévő folyadékoszlop mozgását. Ezen fejlesztéssel teret nyitottak a szélesebb körű felhasználásra, mint például kolloidális spektroszkópiára, élő sejtés vagy bakteriális rendszerek valós idejű mechanikai manipulációjára, illetve nanolitográfiás eljárásokra [3] (1. ábra).

2. A FLUIDFM MÉRŐFEJEK ELŐÁLLÍTÁSA

A FluidFM lehetőségeinek kiaknázását többféle kialakítású mérőfejek teszik lehetővé, melyek össze vannak kötve a folyadékmozgató rendszerrel. Először 2004-ben készítettek először nanofluidikával ellátott tűket [4], mely eljárás hasonló az AFM tűk gyártásához. Általában a tűk alapanyaga egykristályos szilícium vagy szilícium-nitrid (SixNy), melyet a klasszikusnak nevezhető fotolitográfiával kombinált anizotróp kémiai maratással alakítanak ki. A külön kialakított bemélyedéseket tartalmazó Si mikroszerkezetek bondolásával (ragasztásmentes kötésével) alakítják ki a mérőfejeket úgy, hogy bennükfusszon a nanofluidikai csatorna. A konzolok legfontosabb paramétereit – a rugóállandót és a rezonanciafrekvenciát – a konzol geometriai paramétereivel valamint a SiN-aránnyal, mint anyagi jellemzővel, lehet széleskörűen szabályozni. A konzolok rezonancia frekvenciája általában 1 kHz-től 1MHz-es tartományban mozog és a rugóállandójuk 0,01-től egészen 50 N/m-ig terjed. Jellemzően puhább (kisebb rugóállandójú) szondát kapunk, ha magasabb szilícium-nitrid tartalmat alkalmazunk a készítés során. A csúcsos háromszögben végződő hasáb a konzol tipikus geometriája, melynek a végén található a 15 nm-nél kisebb lekerekítési sugarú tű. A FluidFM mérőfejei is a hagyományos SixNy vegyületből állnak, és egy ilyen rugólapkán egy-vagy akár többcsatornás rendszerek is kiépíthetők. A nanofluidikai csatornák kivezetőnyílása általában egy piramis csúcsán vagy mellette elhelyezkedő nyílás, amit fotolitográfiával, vagy fókuszált ionnyalábos anyageltávolítással állítanak elő [4].

3. A FLUIDFM KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ MÉRŐFEJEINEK ALKALMAZÁSA

A FluidFM három típusú mérőfejjel rendelkezik, amelyekkel különböző alkalmazások és kísérletek valósíthatók meg (2. ábra). A FluidFM mikropipetta feje nem rendelkezik túszerű struktúrával a konzol végén, csupán egy kör alakú kivezető nyílás ad utat a fluidikának. Ezek a mérőfejek elsősorban sejtadhéziós mérésekre lettek kifejlesztve (2. ábra. a)), segítségével sejtmechanikai erőhatásokat tudunk mérni a piko-Newtonos skálán. A mikropipetta mérőfej kivezetése 2-8 μm átmérőjű, azonban amíg ez az átmérő is meglehetősen kicsinek számít, addig a FluidFM nanopipetta mérőfejének átmérője 300 nm, mely mérőfej hagyományos túszerű struktúrájú és a piramis csúcsán helyezkedik el a fluidika kivezető nyílása (2. ábra. d)). A nanopipetta mérőfeje leginkább bakteriális adhézió méréséhez vagy nanolitográfiához használatos. A legkisebb átmérőjű mérőfej a gyorsprototipizáló fej, melynek kivezető csatornája 30 nm-es átmérőjű és elsősorban femtoliter mennyiségű folyadékok célzott célbajuttatásáért felel (2. ábra. c)). Segítségével képesek vagyunk sejteket megjelölni fluoreszcens festékekkel, vagy esetleg gyógyszermolekulákat célzottan a sejttesten belülré fecskendezni.

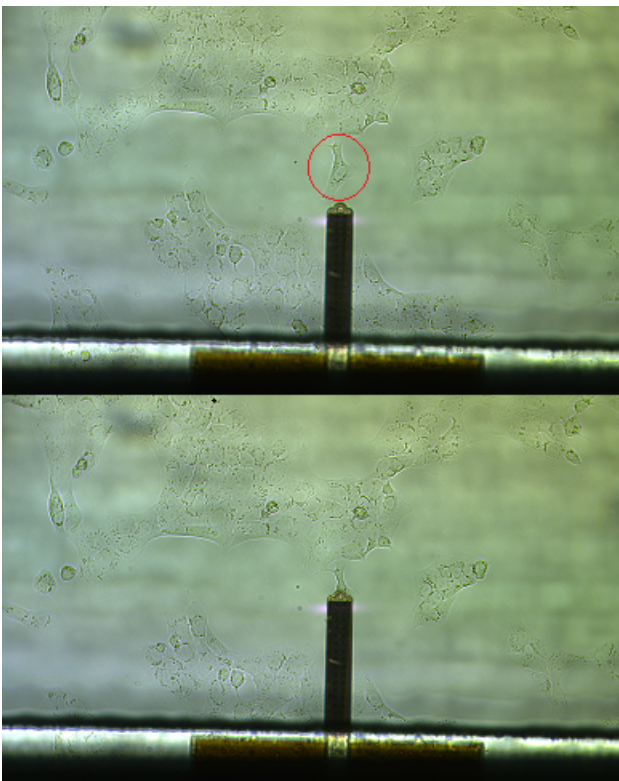


2. ábra. A FluidFM mérőfejek elektronmikroszkópos képei: a) a FluidFM mérőszondájának geometriai elrendezése; b) a mikropipetta mérőfej; c) a gyorsprototipizáló mérőfej; d) a nanopipetta mérőfej [5]

4. A FLUIDFM JÖVŐJE

Habár a technológia már egy évtizede ismert és a rendszert, valamint a belőle származó eredményeket már több rangos nemzetközi folyóiratban is publikálták [6,7], valóságos fellendülés következhet be technológiai újításoknak köszönhetően. A FluidFM működési sokoldalúsága erős

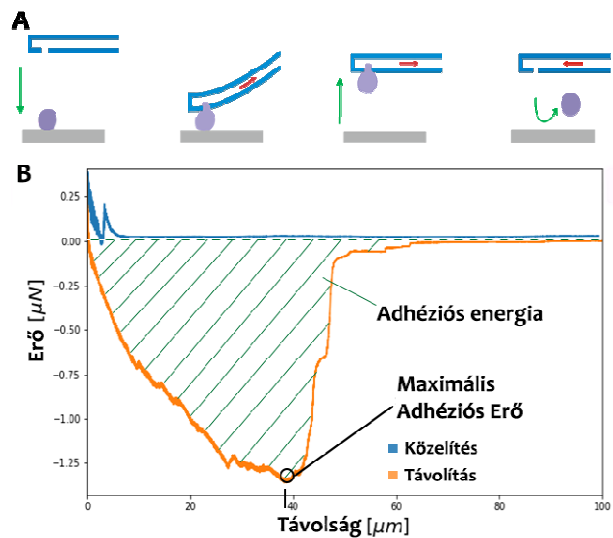
háttértámogatást nyújthat interdiszciplináris kutatásoknak, hiszen számos funkciója rávilágíthat eddig nem vizsgált, sőt esetleg ismeretlen eredetű jelenségekre. A Cytosurge AG. egyik legújabb fejlesztése a FluidFM Bot, amely egy nagyáteresztőképességű robotizált FluidFM berendezés, melynek segítségével képesek vagyunk automatizált méréseket végezni. Például amíg a sejtheadhézió területén korábban csak 1–2 mérés volt lehetséges a technológiai korlátok miatt, a FluidFM Bot akár 10–20 mérést is képes kivitelezni egy órán belül (3. ábra). A fekete színű szonda egy sejt kultúra felett adott parancsra megközelíti a mérni vagy manipulálni kívánt egyedi élő sejtet (piros kör), amelyhez $\mu\text{m/s}$ -os sebességgel közelít. Amikor elérte a kívánt felület és szonda között kialakult erőhatást (kb. 3 nN [1]), akkor szívó hatást fejt ki a szétterült sejt. Egy kis várakozás után eltávolodik a felszíntől és felszakítja a sejtet az aljatról. Nyomás ráadásával a mért sejt eltávolítható a konzolról. Utóbbi folyamat során meghatározható a sejt adhéziós ereje és adhéziós energiája (4. ábra).



1. ábra. A FluidFM adhéziómérés közben

A magyar kutatási életben is jelen van ennek a technológiának az alapkövei, ugyanis Dr. Horváth Róbert által vezetett MTA EK MFA Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoportban üzemeltek be egy új FluidFM Bot-ot 2017-ben. A

csoport célja olyan jelölésmentes, modern biofizikai módszerek fejlesztése és alkalmazása az élettudományok különböző területein, amelyek ipari és tudományos szignifikanciával bírnak [8].



4. ábra. Sejtheadhézió mérés: a) sejtheadhézió mérésének folyamata [3]; b) a FluidFM segítségével minden sejtire egyedi jellegű erő-távolság görbét tudunk kimérni, amelyből számos információ kinyerhető

A FluidFM működésének kulcsfontosságú pontja a precízen szabályozott nanofluidikai rendszer, mellyel egyszerre tudunk szívást illetve nyomást kifejteni az adott rendszerre, és ezáltal vagyunk képesek nanolitográfias nyomtatásra, élő organizmusok sérülésmentes „megfogására” és felületi kitapadásuk kvantitatív vizsgálatára, mikroszkopikus objektumok nagy precizitású mozgatására. Túllépve az AFM korlátait, a FluidFM olyan automatizált, minimális anyagmennyiségű mérésekre ad lehetőséget, melyeket korábban csupán nagy körültekintéssel vagy egyáltalán nem lehetett megoldani. Hasonló nanofluidikai rendszerek már bizonyítottan jelen vannak a mindennapi orvosi diagnosztikában, mint például a „lab-on-chip” eszközök, melyek a gyors, hordozható és megbízható diagnózis felállításában segíthetnek. Elképzelhető, hogy a FluidFM technológiáját hamarosan a klinikai diagnosztikában is alkalmazni fogják, ugyanis számos kutatás korrelációt mutatott ki a sejtek rugalmassága és gyulladásra, vagy tumoros elváltozásra való hajlamuk között [9,10]. Ilyen és hasonló biológiai információk kvantitatív tanulmányozására kifejezetten alkalmas a FluidFM, mert pl. egyszerűen, kis mintamennyiségből meg lehet határozni, hogy egy adott páciens sejtjei

milyen tumorokra jellemző rugalmassági paraméterekkel rendelkeznek, és ezért a technológia segíthet egy korai diagnózis felállításában is. Továbbá mivel a FluidFM képes femtoliteres folyadék mennyiségek célzott célbajuttatására, ezért lehetőség nyílik minimális anyagfelhasználás mellett rákos sejteket tesztelni, hogy milyen tumorelleses gyógyszerekre rezisztensek vagy érzékenyek, és így a FluidFM technológia költséghatékony és újszerű utakat nyithat meg a hatékonyabb terápiák kidolgozásában is.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Meister A., Gabi M., Behr P., Studer P., Vörös J., Niedermann P., Bitterli J., Polesel-Maris J., Liley M., Heinzmann H., Zambelli T., „FluidFM: Combining Atomic Force Microscopy and Nanofluidics in a Universal Liquid Delivery System for Single Cell Applications and Beyond”, *Nano Lett.*, 9. évfolyam, 6. szám, 2501-2507 o., 2009.
<https://doi.org/10.1021/nl901384x>
- [2] Binnig G., Quate C.F., Gerber C., „Atomic Force Microscope”, *Phys. Rev. Lett.*, 56. évfolyam, 930-933 o., 1986.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- [3] <https://www.cytosurge.com/>
- [4] Deladi S., Tas N.R., Berenschot J.W., Krijnen G.J. M., de Boer M. J., de Boer J. H., Peter M., Elwenspoek M.C., „Micromachined fountain pen for atomic force microscope-based nanopatterning”, *Appl. Phys. Lett.*, 85. évfolyam, 5361-5363 o. 2004.
<https://doi.org/10.1063/1.1823040>
- [5] <http://smartmanufacturingseries.com/wp-content/uploads/2017/10/zambelli.pdf> (2017)
- [6] Sancho A., Vandersmissen I., Craps S., Luttun A., Groll J., „A new strategy to measure intercellular adhesion forces in mature cell-cell contacts”, *Sci. Rep.*, 7. évfolyam, 46152, 2017.
<https://doi.org/10.1038/srep46152>
- [7] Sankran S., Jaatinen L., Brinkmann J., Zambelli T., Vörös J., Jonkheijm P., „Cell Adhesion on Dynamic Supramolecular Surfaces Probed by Fluid Force Microscopy-Based Single-Cell Force Spectroscopy”, *ACS Nano*, 11. évfolyam, 3867-3874 o., 2017.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00161>
- [8] <http://nanobiosensors.com/>
- [9] Guillaume-Gentil O., Potthoff E., Ossola D., Franz C.M., Zambelli T., Vorholt J.A., „Force-controlled manipulation of single cells: from AFM to FluidFM”, *Trends Biotechnol.*, 32. évfolyam, 7. szám, 381-388 o., 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.04.008>
- [10] Cross S.E., Jin Y., Rao J., Gimzewski J.K., „Nanomechanical analysis of cells from cancer patients”, *Nat. Nanotechnol.*, 2. évfolyam, 780-783 o., 2007.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2007.388>