

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Tereza Schwarzová

Atomic Force Microscopy a vizualizace rozdílů ve struktuře buněčných stěn mladých a starých kvasinek *S. cerevisiae*

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí diplomové práce: *Prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.*

Studijní program: *Fyzika, Učitelství fyziky - matematiky*

2008

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce Prof. RNDr. Jaromíru Pláškoví, CSc za odbornou i technickou pomoc a podporu při měření a vypracování textu. Dále děkuji panu RNDr Zbyňku Pientkovi, CSc za zaškolení do práce s AFM. Můj velký dík patří Michalu Reiterovi za veškeré dodané materiály, obrovskou pomoc při měření a všechny jeho cenné rady. Děkuji Doc. Ing. Aleně Píchové, CSc za poskytnutí kvasinek. Za kultivaci kvasinek a péči v laboratoři vděčím Ivaně Benešové. V neposlední řadě děkuji Liboru Lorencovi za podporu a pomoc s grafickými úpravami.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 17.4.2008

Tereza Schwarzová

Obsah:

1. Mikroskopie atomárních sil	5
1.1. Detektory signálu	8
1.2. Ramínka a hroty	9
1.3. Rozlišovací schopnost.....	10
1.4. Skener.....	11
1.5. Nelinearity skeneru	12
1.6. Artefakty a problémy měření	15
1.7. Analýza biologických vzorků	16
2. Kvasinky	18
2.1. Struktura kvasinky	18
2.2. Nepohlavní rozmnožování	19
2.3. Jizvy	19
2.4. Růst kultury kvasinek	20
2.5. Průmyslový význam kvasinek	20
3. Metody a materiály	21
3.1. Nastavení mikroskopu	21
3.2. Zpracování obrázků	19
3.3. Použité kvasinky	22
3.4. Příprava vzorků	23
4. Výsledky a diskuze.....	26
4.1. Artefakty	26
4.2. Zobrazení jizvy	28
4.3. Vizualizace povrchu kvasinek s různým množstvím MDR pump	30
4.4. Rozdíly buněčných stěn reprodukčně mladých a starých kvasinek.....	32
4.5. Ukázky zobrazení kvasinek jinými optickými metodami	35
5. Závěr	36
Literatura	37

Název práce: *Atomic Force Microscopy a vizualizace rozdílů ve struktuře buněčných stěn mladých a starých kvasinek S. cerevisiae*

Autor: Tereza Schwarzová

Katedra (ústav): Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.

e-mail vedoucího: plasek@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt:

Cílem práce bylo zobrazit metodou mikroskopie atomárních sil (AFM) rozdíly ve struktuře buněčných stěn mladých a starých kvasinek *S. cerevisiae* a zjistit, jaký vliv na buněčnou stěnu má koncentrace glukózy v živném médiu. AFM je založena na měření sil mezi povrchem zkoumaného vzorku a hrotem, který povrch rastruje. Tato metoda umožňuje zkoumat buněčnou stěnu kvasinek v jejich přirozeném prostředí – ve vodě, přičemž lze zobrazit detaily o rozměrech řádově desítek nanometrů. Použity byly kvasinky kmenů AD 1-3, IL, US stejného stáří a kmenů JC 482A (označovány jako #013) a AD-JC 488A (označovány jako #015) staré jeden, dva a pět dní. Podařilo se nasnímat mnoho kvalitních obrázků srovnatelných s nejlepšími AFM snímky publikovanými v textech zabývajících se touto problematikou. Zejména se povedly detailně zobrazit oblasti jizev, které vznikají na povrchu kvasinek při jejich pučení a následném oddělení dceřinné buňky. Měření prokázalo výrazné změny buněčné stěny kvasinky v průběhu stárnutí (zvrásnění, zhrubnutí struktury). Vliv glukózy na strukturu buněčné stěny nebyl prokázán. Výsledky tohoto měření mohou být podkladem k dalšímu zkoumání buněčné stěny kvasinek metodou AFM.

Klíčová slova: AFM, kvasinky, *S. cerevisiae*, buněčná stěna, jizva

Title: *Atomic Force Microscopy (AFM) used to reveal differences in the cell wall structure of young and old S. cerevisiae yeast cells*

Author: *Tereza Schwarzová*

Department: *Faculty of Mathematics and Physics, Charles University*

Supervisor: *Prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.*

Supervisor's e-mail address: plasek@karlov.mff.cuni.cz

Abstract:

The main goal of this MSc. is to use Atomic Force Microscopy (AFM) in studies of yeast cell wall structure aimed at (i) expected differences between young and aged S. cerevisiae cells, (ii) the effects of glucose concentration in culturing media on the quality of yeast cell wall. AFM can image biological systems with molecular resolution in real time, and under natural condition. Numerous AFM images of the surface of S. cerevisiae yeast cells (strains AD 1-3, IL, US and JC 482A, AD-JC 488A) have been obtained, which surpassed that one of standard results of still-rare AFM studies of yeast cells. No clear effect of glucose concentration has been found. On the other hand, AFM studies have revealed ageing-related changes in the structure of yeast cells (crumpling, rough surface). High-resolution images of yeast bud scars, including their fine details were also obtained.

Keywords: *AFM, yeasts, S. cerevisiae, cell wall, scars*

1. Mikroskopie atomárních sil (AFM)



Obr. 1: Mikroskop atomárních sil.

V klasické optické mikroskopii pozorujeme vzorek vždy z velké vzdálenosti (v porovnání s vlnovou délkou světla λ) a vidíme ho v jednom časovém okamžiku celý. Nevýhodou této metody je nízké rozlišení, které je omezeno právě vlnovou délkou použitého světla. Nelze tak získat obraz detailů menších než $0,5 \lambda$.

Pro zkoumání povrchů byla vyvinuta zcela odlišná technika, kdy se k zobrazení povrchu vzorku používá rastrovací sonda (SPM – Scanning Probe Microscopy) [3], [4], [5]. V roce 1979 byl uveřejněn vynález rastrovacího tunelového mikroskopu (STM – Scanning Tunneling Microscopy) fyziků Gerda Binniga a Heinricha Rohrera, za který byli roku 1986 odměněni Nobelovou cenou. Metoda STM je založena na tunelovém jevu (pravděpodobnost průchodu elektronů energetickou bariérou) mezi elektricky vodivým hrotem a vodivým vzorkem. Přiložíme-li na hrot a povrch vzorku napětí, vytvoří se mezi nimi tok elektronů – tunelový proud, jehož velikost je exponenciálně závislá na vzdálenosti hrotu od vzorku. Proto lze z naměřených hodnot tunelového proudu při rastrování sestavit topografický obraz povrchu vzorku.

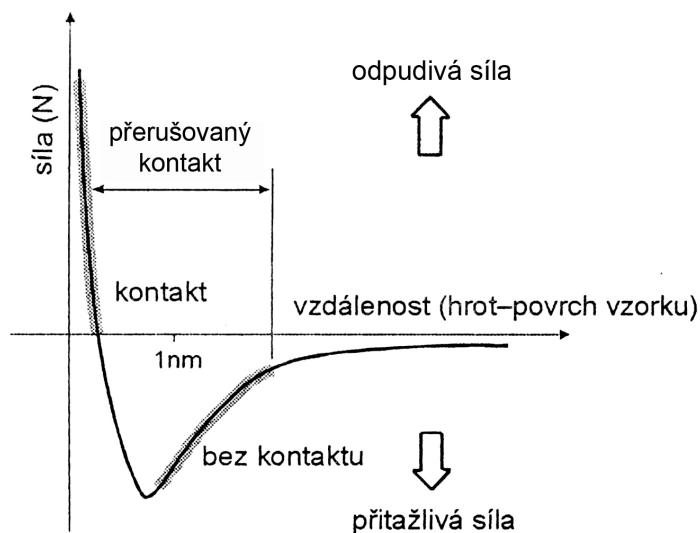
Nevýhodou STM je, že lze zobrazovat jen vodivé nebo polovodivé materiály, nevodiče se musí pokrývat vodivou vrstvou, čímž se zmenšuje rozlišení. Tento problém řeší mikroskopie atomových sil - Atomic Force Microscopy (AFM) [1], [2], [15] - [24].

Metoda AFM je založena na měření sil mezi povrchem zkoumaného vzorku a hrotem, který povrch rastruje. Hrot, jehož špička má průměr kolem 10 nm, je připevněn na ramínku. Při přiblížení hrotu k povrchu vzorku vznikají přitažlivé nebo odpudivé síly

způsobující ohnutí a torzi ramínka. Toto ohnutí je snímáno citlivým detektorem. Zpravidla se detekuje pomocí laserového paprsku, který se odráží od ramínka a dopadá do kvadrantového fotodetektoru (fotodetektor rozdělený na čtyři části). Tím je ohnutí převedeno na měření napětí. Výsledky vyhodnocuje počítačový program, který vytvoří topografický obraz povrchu vzorku.

Pohyb hrotu (nebo vzorku) ve všech třech směrech x , y , z umožňuje skener vyrobený z piezoelektrického materiálu. Výška hrotu nad vzorkem je řízena obvody zpětné vazby.

Výhodou této metody je, že lze zkoumat jak vodivé tak nevodivé materiály s rozlišením až na atomární úrovni. Síly mezi hrotem a vzorkem mohou být různé fyzikální podstaty. Nejčastěji se ale uplatňují přitažlivé van der Waalsovy síly a odpudivé síly plynoucí z Pauliho principu. Závislost meziatomových sil na vzdálenosti hrotu od vzorku je znázorněna na obr. 2.



Obr. 2: Závislost meziatomových sil na vzdálenosti hrotu od vzorku. Převzato z [1].

Působící síly

- Magnetické a elektrostatické síly delšího dosahu
- Van der Waalsovy síly: Nejvíce se projevují na vzdálenost od 10 nm do desítek nm.
- Kapilární síly: Jsou způsobené přítomností vody v blízkosti hrotu, díky povrchovému napětí tak vznikají přitažlivé síly.
- Síly krátkého dosahu (Pauliho): Převažuje odpudivá síla (iontová) vznikajících při vzájemné vzdálenosti hrotu od vzorku menší než součet atomových poloměrů. Dál při tak malých vzdálenostech musíme brát v úvahu fyzikální sorpci a chemisorpci (vazba mezi hrotem a vzorkem), kovovou adhezi (při přiblížení dvou kovů dojde k přesunu elektronů a vzniku přitažlivé síly), tření, elasticitu, plastickou deformaci (např. změna tvaru hrotu).

Podle vzdálenosti hrotu od vzorku rozlišujeme dva režimy, ve kterých může mikroskop pracovat (jak je naznačeno v obrázku). Režim kontaktní a nekontaktní.

Kontaktní režim

V kontaktním režimu převládají odpudivé síly a ramínko s hrotem musí mít tuhost menší než je vazebná síla mezi atomy vzorku. Kdyby byla tuhost ramínka větší, místo jeho ohybu by došlo k posuvu atomů vzorku nebo hrotu.

Kromě odpudivých sil vznikají v kontaktním režimu síly kapilární a síla vycházející z vlastního ramínka. Výsledná síla hrotu na vzorek se pohybuje od 10^{-8} N do 10^{-6} N. Jelikož v tomto režimu dochází ke kontaktu hrotu se vzorkem, hodí se především ke zkoumání tvrdších materiálů.

Kontaktní režim má dvě modifikace:

- S konstantní výškou, kdy je udržována určená hodnota výšky hrotu (z -ová souřadnice) a měří se prohnutí ramínka. Ohyb ramínka ale dokáže pokrýt jen malý vertikální rozsah.
- S konstantní silou, kdy se udržuje stále stejné ohnutí ramínka (konstantní síla na vzorek) a skener posouvá hrotem nebo vzorkem ve svislém směru. Tento režim se používá častěji, protože se vyvarujeme závislosti na kapilárních silách a dosáhneme většího rozpětí na vertikální ose. Musíme ale skenovat menší rychlostí. K udržování konstantní síly se používají obvody zpětné vazby.

Nekontaktní režim

V tomto režimu vibruje ramínko s hrotem v blízkosti vzorku, ve vzdálenosti jednotek až desítek nanometrů. Výsledná velikost síly hrotu na vzorek je kolem 10^{-12} N. Díky malé síle je nekontaktní režim vhodný pro měření měkkých a pružných vzorků, výhodou je, že vzorek není deformován dotykem hrotu.

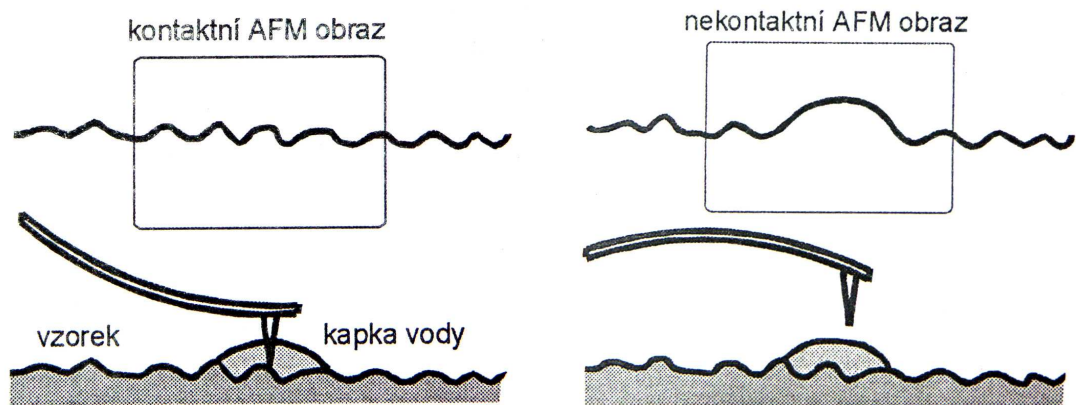
Protože na hrot působí přitažlivá síla, musíme používat ramínka s větší tuhostí, aby nedošlo k poškození vzorku. Malá síla ale způsobí i malé ohnutí ramínka, takže výsledný signál je oproti kontaktnímu režimu slabý. Na měření pak mají větší vliv okolní vibrace.

Ramínko s hrotem kmitá v okolí rezonanční frekvence tj. asi od 100 kHz do 400 kHz. Měří se změna rezonanční frekvence nebo amplituda kmitů ramínka při přibližování a vzdalování od vzorku.

Vztah mezi rezonancí ramínka a topografií vzorku můžeme vysvětlit takto: Při přiblížení hrotu ke vzorku na vzdálenost r se zvětší síla F působící na ramínko a to se prohne. Tím se změní jeho tuhost k a následně i rezonanční frekvence ω , která je přímo úměrná druhé odmocnině z tuhosti.

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m}}, \quad k(F(r))$$

V nekontaktním režimu se interakce účastní větší množství atomů, proto nelze dosáhnout velkého rozlišení. Tento režim se hodí pro měření měkkých biologických vzorků. Není vhodný tam, kde jsou na povrchu vzorku kapky zkondenzované vody. Povrch by byl vykreslen i s kapkou nebo by se mohlo stát, že hrot bude stažen do některé kapky a nebude mít sílu se uvolnit (viz. Obr. 3).

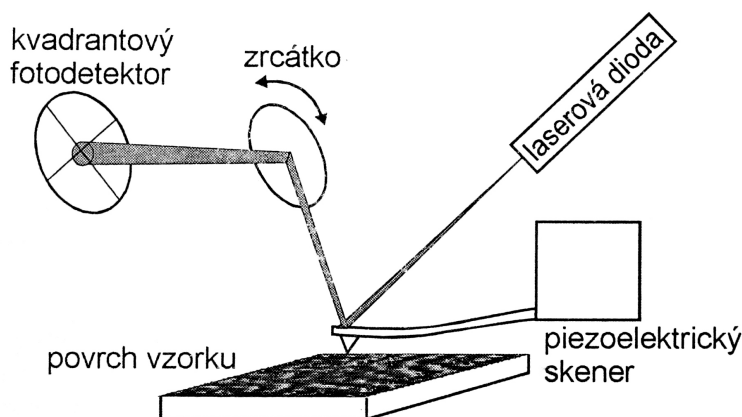


Obr. 3: Zobrazení povrchu s kapkou vody v kontaktním a nekontaktním režimu. Převzato z [1].

Pokleповý režim

Tento režim (tapping mode) je podobný nekontaktnímu režimu, jen rozkmit ramínka je větší, takže dochází k dotyku hrotu se vzorkem. Je vhodný pokud má povrch vzorku větší výškové rozdíly (takže se nehodí nekontaktní režim) a tam, kde by za použití kontaktního režimu mohlo dojít k tažení vzorku nebo jeho poškození.

1.1. Detektory signálu



Obr. 4: Schéma detekce ohybu ramínka. Převzato z [1].

Detektor slouží k získání informace o interakci hrotu se vzorkem. Nejběžnější je optická detekce pomocí laserového paprsku (Obr. 4), který se odráží od ramínka (za tímto účelem musí být ramínko pokryto odrazivým materiálem) a dopadá do fotodetektoru. Zpravidla se používá kvadrantový fotodetektor, což je detektor rozdělený na čtyři části.

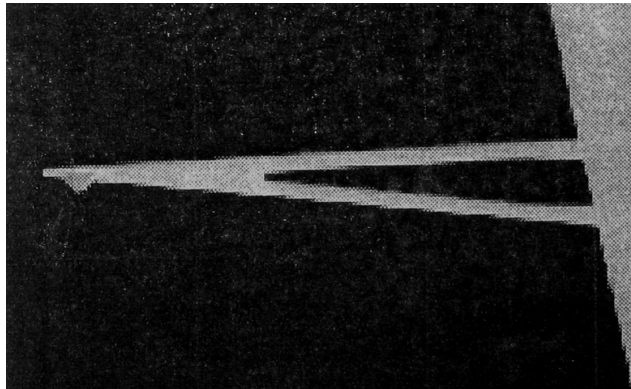
Před měřením se mechanicky nastaví paprsek tak, aby dopadal na špičku ramínka. To lze kontrolovat vizuálně pomocí optického mikroskopu. Dál se nastaví celý systém tak, aby energie laserového paprsku odraženého do fotodetektoru byla ve všech čtyřech částech fotodetektoru stejná. Ohyb ramínka se projeví tak, že osvětlení v horní a dolní části detektoru už není stejné. Torze (zkrut) ramínka zase způsobí, že není stejné osvětlení v levé a pravé části detektoru. Tak dostáváme dvě informace: o topografii vzorku a o bočních silách vzorku na hrot.

Další metodou je detekce diferenciálním interferometrem, kdy dva laserové paprsky s navzájem kolmou polarizací dopadají na ramínko v různé vzdálenosti od jeho upnutí. Díky ohybu ramínka urazí oba paprsky rozdílnou dráhu a to se projeví na jejich interferenci.

Speciální metodou je detekce pomocí ramínka z piezorezistivního materiálu. Měří se odpor piezorezistoru, který se při ohnutí ramínka mění.

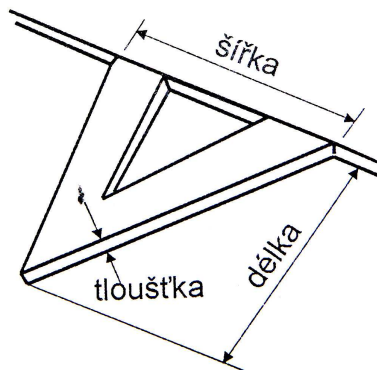
Detektor je spojen s piezoelektrickým skenerem zpětnovazebným obvodem, který udržuje konstantní ohnutí ramínka popřípadě konstantní z-ovou souřadnici hrotu.

1.2. Ramínka a hroty



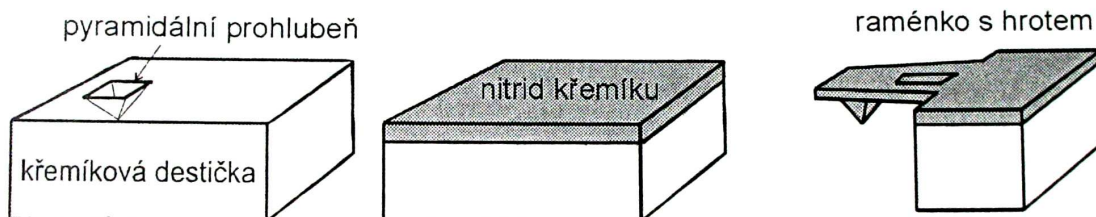
Obr. 5: Snímek ramínka s hrotem. Převzato z [1].

Zatímco hrot snímá meziatomární sílu, ramínko informací o této síle přenáší do okolí. Hrot i ramínko bývají vyrobeny ze stejného materiálu. Požadavky kladené na ramínko jsou vysoká rezonanční frekvence a malá setrvačnost. Protože při dotykovém režimu působí na hrot i velké boční síly a ramínko musí být tedy odolné proti zkroucení, jeví se jako nejvhodnější tvar ramínka tvar písmene V nebo X. Vlastnosti ramínka závisí na jeho použití. Ramínko bývá charakterizováno těmito rozměry (Obr. 6): délka 100-200 μm , šířka 10-40 μm , tloušťka do 2 μm . Poloměr špičky hrotu 5-10 nm, délka hrotu 5-15 μm .



Obr. 6: Rozměry ramínka. Převzato z [1].

AFM hroty jsou obvykle vyrobeny z křemíku nebo nitridu křemíku. Tvar hrotu závisí na materiálu a výrobním procesu.



Obr. 7: Postup výroby hrotu. Převzato z [1].

Příklad výroby hrotu z nitridu křemíku je znázorněn na obr. 7. Na krystalickou křemíkovou desku, ve které je odleptaná prohlubeň tvaru jehlanu, je nanášena vrstva nitridu křemíku Si_3N_4 . Nitrid se vyžihá a litograficky vytvaruje. Tak vznikne pyramidální hrot.

Křemíkové kuželové hroty se vyrábí odleptáváním křemíku kolem čepičky z oxidu křemičitého. Pyramidální hroty jsou širší, proto se pro zobrazování ostřejších a hlubších struktur více hodí kuželové hroty, které jsou ale zase náchylnější ke zlomení. Nitrid křemíku je tvrdší než křemík, proto vytváří hroty trvanlivější.

Kromě výše popsaných, existuje mnoho dalších druhů výroby hrotů, vyrábí se například i hroty, které se zároveň používají pro více druhů mikroskopie.

AFM nevyžaduje jen ostrý hrot, ale i ramínko tuhosti nižší než je vazebná síla mezi atomy (asi 10 Nm^{-1}). Čím kratší a silnější ramínko, tím je tužší a má větší rezonanční frekvenci.

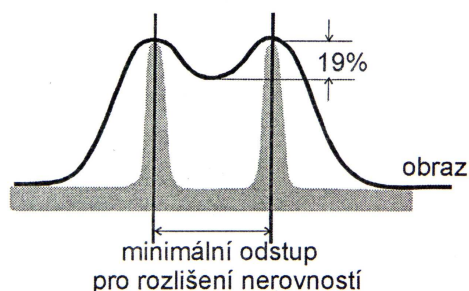
1.3. Rozlišovací schopnost

Vertikální rozlišení bývá podle typu hrotu asi 0,1 nm a menší.

Příčné rozlišení AFM obrazu je dáno velikostí obrazu a křivostí špičky hrotu. Mějme obraz $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ složený z 512×512 obrazových bodů. Rozlišení by mělo pak být asi 2 nm ($1 \mu\text{m}/512$).

Ostřejší hroty mají poloměr křivosti kolem 5 nm. Protože plocha interakce mezi hrotem a vzorkem je dána křivostí hrotu, tyto hroty poskytují obvykle rozlišení 1 až 2 nm. Proto zvětšení AFM obrazů větší než $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ je dáno velikostí skenované plochy a nezávisí na křivosti hrotu.

Rozlišení se definuje podle dvou blízkých ostrých vyvýšenin. Oba detaily budou rozlišitelné, pokud se v obraze mezi nimi projeví aspoň dvacetiprocentní pokles. Experimentálně bylo zjištěno, že běžně používané mikroskopy mají rozlišení mezi 1 nm až 2 nm.



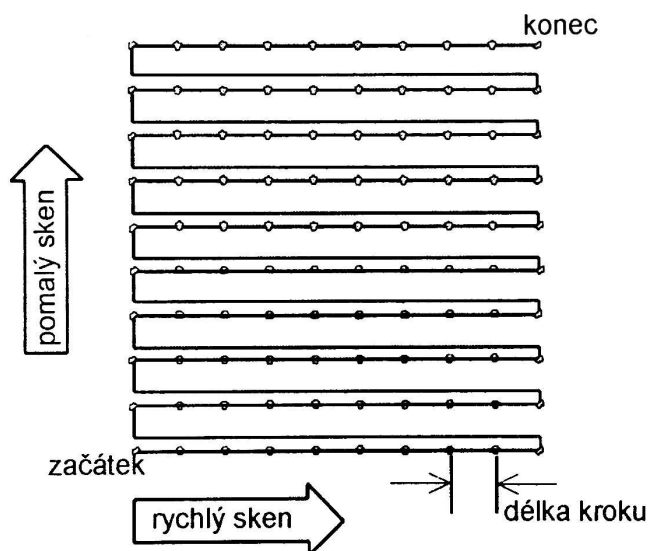
Obr. 8: Příčné rozlišení. Převzato z [1].

Metodou AFM tedy nelze dosáhnout reálného atomového rozlišení (např. při zjišťování vakancí v krystalové mřížce). Některé atomy hrotu totiž interagují s více atomy povrchu vzorku.

1.4. Skener

Skenování je realizováno piezoelektrickými materiály, protože mechanicky nelze dosáhnout požadované přesnosti jemného posuvu. Konstrukce skeneru se liší podle toho, jestli pohybuje hrotem nebo vzorkem.

Skener se pohybuje po vybrané ploše tam a zpět podél prvního řádku, pak se o určenou hodnotu posune na další řádek, a tak dále. Přitom nabírá data pouze v jednom směru, při návratu zpět data nenabírá. Skener zpravidla vykonává i přibližovací a měřicí pohyb ve směru kolmém na vzorek. Velikost skenované plochy se pohybuje od desítek nm po stovky μm . Počet bodů na řádek bývá od 64 do 1024 podle druhu skeneru.



Obr. 9: Pohyb skeneru ve vodorovné rovině. Převzato z [1].

Základním piezoelektrickým materiálem většiny skenerů je keramická směs-olovnatý zirkonium titanát $\text{Pb}(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$ – do které se podle požadovaných vlastností přidávají různé příměsi. Je to polykrystalická pevná látka, jejíž každý krystal má svůj dipólový moment. Dipólové momenty jsou zprvu orientovány náhodně, proto se musí

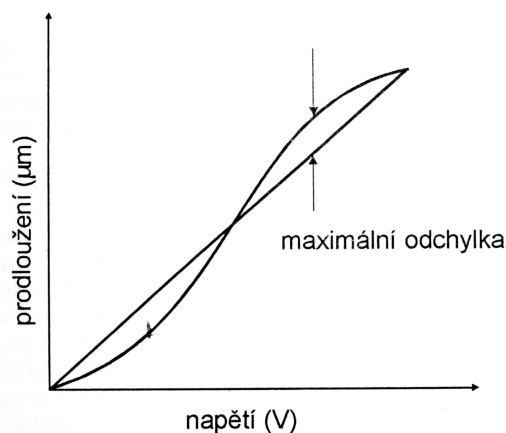
piezoelektrický materiál ještě zahřát a přiložit ke stejnosměrnému napětí, které dipóly orientuje jedním směrem. Poté se materiál musí rychle zchladit. Takto pólováný skener reaguje na vnější napětí prodloužením nebo kontrakcí. Polarizaci ovlivňuje časté používání skeneru (čím častěji, tím větší polarizace) a okolní teplota (vyšší teplota, rychlejší depolarizace). Skenery konstruované pro pohyb v osách x , y a z mohou fungovat tak, že se v jednom směru prodlužují a v opačném zkracují.

Problémem piezoelektrický skenerů někdy může být malá skenovací plocha, která je dána velikostí skeneru. Proto se někdy používají elektrodynamické skenery i za cenu nižšího rozlišení. Jsou složeny ze čtyř cívek, jejichž středy leží ve vrcholech čtverce. Pohyb se uskutečňuje přiložením napětí na jednotlivé páry cívek. Tak lze dosáhnout skenovací plochy o straně 1,2 mm s rozlišením 10 nm.

1.5. Nonlinearity skeneru

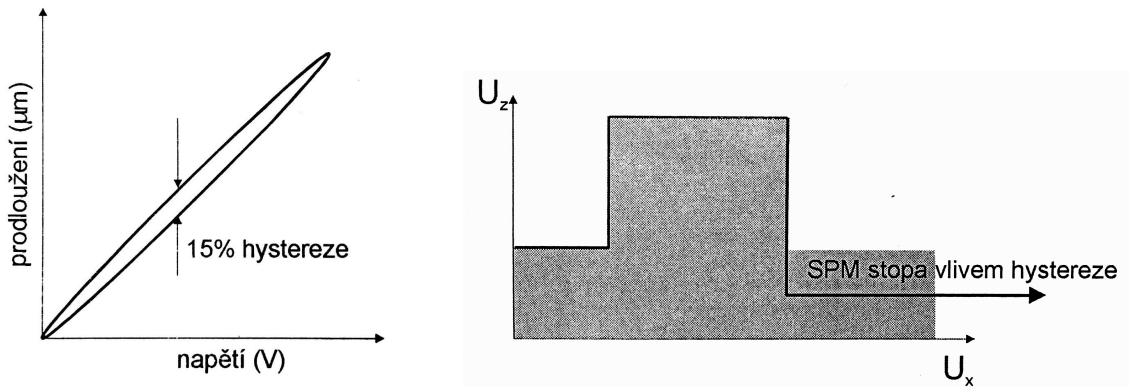
Teoreticky je výchylka ideálního piezoelektrického skeneru lineární funkcí přiloženého napětí. Reálný skener ale trpí některými poruchami.

Vlastní nelinearita: Tato chyba je způsobena přímo materiálem skeneru. Grafem závislosti prodloužení na napětí není přímka, ale ve skutečnosti má graf tvar písmene s (Obr. 10). Vlastní nelinearita bývá patrná až při skenování větších ploch a pohybuje se v mezích od 2% do 25%. Projevuje se zborcením obrazu testovací rovinné ekvidistantní mřížky.



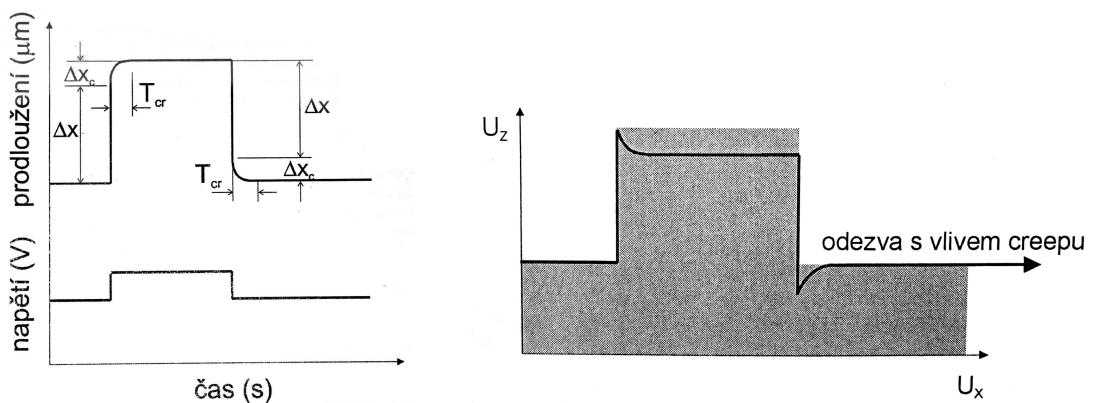
Obr. 10: Graf závislosti prodloužení skeneru na přiloženém napětí u ideálního piezoelektrického materiálu (úsečka) a u reálného piezoelektrika. Převzato z [1].

Hystereze: Předpokládejme, že přivádíme na piezoelektrický skener postupně napětí od nuly do určité hodnoty a pak ho opět snižujeme na nulu. Sestrojíme-li graf závislosti prodloužení na napětí, nebude sestupná část křivky kopírovat vzestupnou, ale vznikne smyčka. Ta je důsledkem hystereze. Plocha smyčky je tím větší, čím je větší intenzita elektrického pole. Tuto vadu vykazuje většina piezoelektrických materiálů. Ta tvoří až 20% z celkových nelinearit skeneru. Pro potlačení vlivu hystereze probíhá skenování pouze v jednom směru. Hystereze ve svislém směru způsobuje chybný profil vzorku. Pokud je v AFM obraz konstruován na základě napětí přivedeného na skener, bude obrys dokonale pravoúhlého schodu vypadat jako na obr. 11.



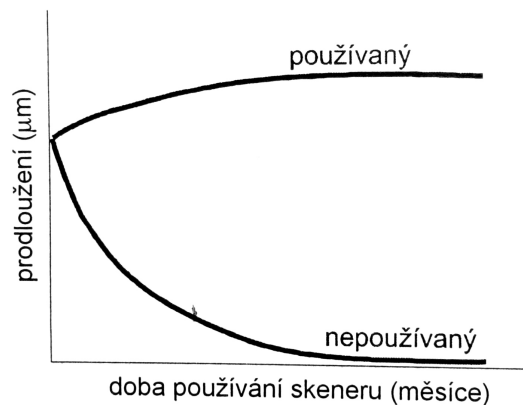
Obr. 11: Vlevo je graf závislosti prodloužení skeneru na přiloženém napětí při jeho postupném zvětšování a následném zmenšování. Vpravo je znázorněn obraz pravoúhlého schodu, jak by se zobrazil vlivem hystereze. Převzato z [1].

Creep (tečení): Creep je jev, který nastává po přiložení napětí. Materiál se nezačne rozpínat homogenně, ale po částech. Těsně po napětovém skoku dojde k určitému prodloužení a pak nějakou dobu prodloužení „dobíhá“. Při měření se to projeví tak, že po přesunutí skeneru do jiného místa vzorku začne vybraná plocha během creepu ujíždět. To může trvat řádově minuty. Proto se nedoporučuje skenovat v rozích. Dalším efektem je rozdílnost obrázků pořízených různými skenovacími rychlostmi.



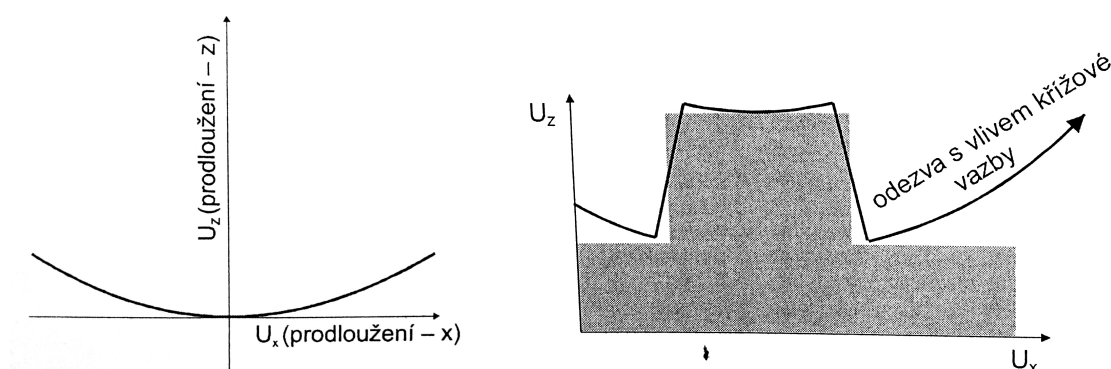
Obr. 12: Vlevo je graf časové závislosti prodloužení skeneru a přivedeného napětí. Creep je charakterizován dobou T_{cr} , za kterou k němu dojde. Vpravo je obraz pravoúhlého schodu, jak by se zobrazil vlivem creepu. Převzato z [1].

Stárnutí skeneru: Stárnutí se projevuje změnou orientace dipólových momentů ve skeneru. Při používání dochází k nasycování, domény jsou při tom neustále natáčeny ve směru skenování. Naopak není-li skener používán, orientují se dipóly náhodně a prodloužení při daném napětí se exponenciálně zmenšuje. Oba tyto děje jsou součástí stárnutí skeneru. Z obrázku 13 také vyplývá, že čím častěji a déle je skener používán, tím většího rozsahu skenování je schopen. Důsledkem stárnutí je chybné určování rozměrů, charakter objektů však zůstává nezměněn.



Obr. 13: Stárnutí skeneru při jeho užívání a nečinnosti. Převzato z [1].

Křížový efekt: Pohyb skeneru podél os x , y se děje podél oblouku (jedna strana se zkracuje, jedna prodlužuje). Aby hrot udržel kontakt se vzorkem, musí ještě konat pohyb ve směru osy z . Toto spojení pohybů může vést k zaoblení rovinného povrchu. Existuje více možných příčin takového zkreslení výsledného obrazu. Například elektrické pole, které není přesně homogenní v celém objemu skeneru.



Obr. 14: Vlevo je znázorněn křížově vázaný pohyb skeneru. Vpravo je obraz pravoúhlého schodu, jak by se zobrazil vlivem křížového efektu. Převzato z [1].

Poruchy skeneru byly popsány jednotlivě, ve skutečnosti ale působí všechny dohromady. Na obrázku pravoúhlého schodu je vidět jejich složený efekt. Ke eliminaci těchto vad se používají softwarové i hardwarové korekce.

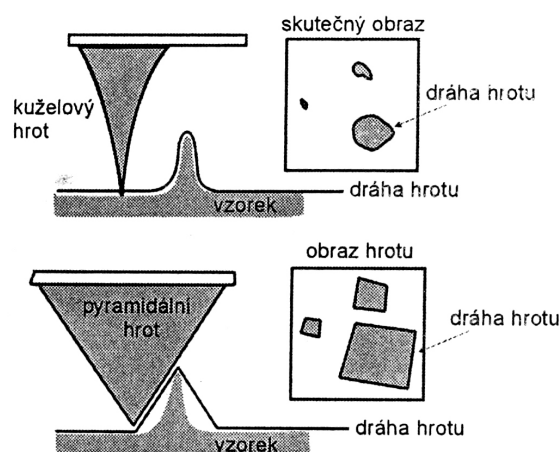


Obr. 15: Vliv hysterese, creepu a křížové vazby na zobrazení pravoúhlého schodu. Převzato z [1].

Drift: Drift je pozvolné ujíždění hrotu vzhledem ke vzorku z různých příčin. Příkladem je různá tepelná roztažnost u jednotlivých konstrukčních částí, tepelný ohřev způsobený průchodem elektrického proudu nebo ohřev použitým osvětlením.

1.6. Artefakty a problémy měření

Zrcadlení hrotu: Pokud snímáme povrch na němž se vyskytují výčnělky, jejichž šířka je menší než šířka hrotu, dojde k tomu, že povrch začne snímat hrot. Nezobrazí se tedy výčnělek na vzorku, ale hrot. Zjistíme-li, že se v obrázku vyskytuje opakovaně stejná struktura stejné orientace, je dobré pootočit vzorkem. Je-li to projev zrcadlení hrotu, zůstane struktura neotočena. Tyto artefakty závisí na tvaru hrotu (viz. Obr. 16). Ostřejší hroty samozřejmě zobrazí detail věrněji. Běžné cenově dostupné hroty mají při vrcholu úhel 45°.



Obr. 16: Zrcadlení hrotu. Převzato z [1].

Stav hrotu: Znečištění hrotu a jeho geometrie má vliv na kvalitu obrazu. Při delším používání dochází ke změně tvaru hrotu, k jeho obroušování a znečišťování. Náhodný prudký dotyk hrotu s povrchem může způsobit jak poruchu hrotu, tak ohnutí nebo našťípnutí ramínka. Při znečištění ramínka se zase zmenší jeho odrazivost a tím i detekční signál.

Zpětná vazba: Při špatně nastavené zpětné vazbě se v obraze vyskytují chybná data. Je-li vazba příliš silná, dochází k oscilaci a v obraze se objeví falešná vysokofrekvenční periodická struktura. Pokud je naopak vazba moc slabá, hrot se nedrží vzorku a obraz se jeví hladce nebo nezřetelně.

Nabití vzorku: Na nabitém vzorku vznikají mezi vzorkem a hrotem parazitní elektrostatické síly, které vedou ke snížení rozlišení zobrazení.

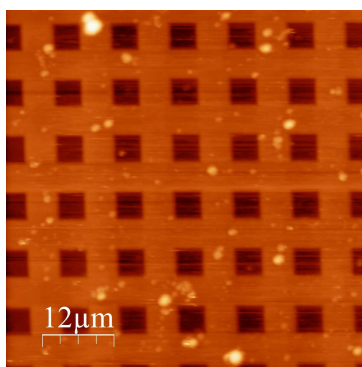
Pevnost vzorku: Není-li povrch vzorku dostatečně pevný, může dojít k jeho poškození (kontaktní režim). Někdy se část vzorku utrhne a zůstane přichycena na hrotu. Tak v obraze vznikají rozmazané čáry. Pokud povrch vzorku není všude stejně pevný, hrot ho

na měkčích místech může promáčknout a ve zobrazení se tyto místa budou jevit jako prohlubně.

Interference: K detekci je použito optické záření, proto musíme brát v úvahu též odrazivost vzorku a ostatních částí hlavy mikroskopu. Světlo od nich odražené může interferovat na povrchu detektoru a tak se vytvoří v falešné struktury.

Při přesvětlení zase fotodetektor ztratí schopnost udržovat zpětnou vazbu a to může způsobit poškození ramínka či hrotu.

Softwarové zpracování: Po naměření se data většinou dále zpracovávají příslušným počítačovým programem, kterým lze odstranit některé obrazové nedostatky. Na druhou stranu při tom může dojít k vytvoření jiných artefaktů. Například nevhodnou filtrací frekvencí se dá vytvořit falešná struktura. Proto je nejprve třeba obraz analyzovat a poté vybrat optimální úpravy.



Obr. 17: Kalibrační mřížka (strana tmavšího čtverce 5 μm), kterou můžeme použít, abychom zjistili, zda se v obrazu nevyskytují některé výše popsané chyby.

1.7. Analýza biologických vzorků

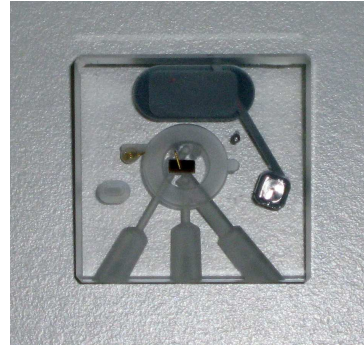
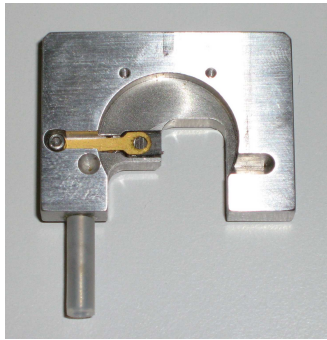
AFM umožňuje práci se vzorky ponořenými do kapaliny, což je výhodné pro studium biologických preparátů, které lze takto studovat nevysušené v jejich nativním stavu. Hrot je přitom celý ponořen v kapalině. Biologické vzorky jsou většinou měkké a křehké a bývá problém s jejich uchycením na pevnou podložku, proto se pro jejich měření příliš nehodí kontaktní režim. Jako vhodnější se často jeví režim poklepový [11], [12], [13], [14].

Pro zobrazování biologických vzorků je rozšířenou metodou elektronová mikroskopie. Ale AFM má oproti EM právě tu výhodu, že můžeme pracovat v kapalině.

Objevují se zde ale tyto problémy:

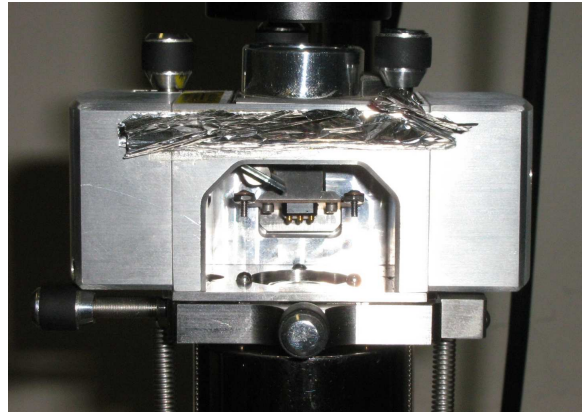
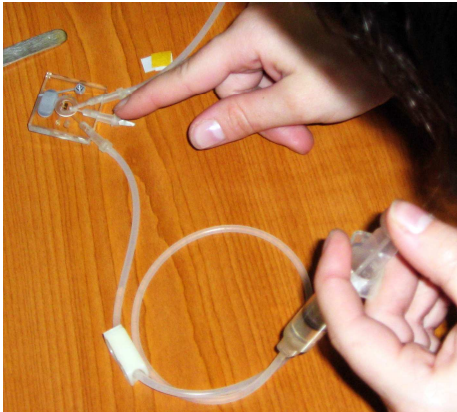
- Vertikální rozsah může být pro některé vzorky nedostatečný.
- Dochází k znečištění hrotu biologickým materiálem.
- Těžko se interpretují získané výsledky. Obraz nemusí odpovídat reálnému tvaru povrchu vzorku, protože interakce mezi povrchem a hrotem bývá různé povahy. Například může dojít k promáčknutí vzorku hrotem.

Vedle topografického obrazu vzorku, lze pomocí AFM získat informace o jeho mechanických vlastnostech. Ke správné interpretaci naměřených dat, se využívají další mikroskopické metody (fluorescenční a jiné optické metody).



Obr. 18: Držák hrotu pro suché prostředí (vlevo) a pro kapalné prostředí (vpravo).

Na fotografiích (Obr. 18) jsou držáky hrotů pro suchý vzorek a pro vodní prostředí. Pro měření ve vodě se do žlábků v držáku zasunou hadičky, které mají na konci injekční stříkačky. Z jedné strany stříkačkou pak po kapkách tlačíme vodu, která vytéká otvorem vedle hrotu na vzorek. Tak se dostane pod vodu jak vzorek tak hrot. Držák na hrot se upevňuje do hlavy mikroskopu (Obr. 19).



Obr. 19: Příprava mokrého vzorku: Do držáku se zasunou hadičky na vodu (vlevo) a celý držák s hrotem se vloží do hlavy mikroskopu (vpravo).

2. Kvasinky



Obr. 20: Kvasinky v živném médiu.

Kvasinky jsou jednobuněčné houbové mikroorganismy, které se množí většinou nepohlavně pučením. Jsou to nejjednodušší eukaryotní organismy a protože existuje analogie s mnoha životními procesy probíhajícími v savčích buňkách, slouží jako modelový systém. Využívají se zejména v potravinářském průmyslu. Například při výrobě lihu, piva, vína, pekařského droždí a mléčných výrobků. Pivní kvasinky, které mají velký obsah vitamínu B, se využívají i při léčbě nervových onemocnění, zánětlivých kožních chorobách, poruchách zažívacího ústrojí a jaterních chorobách.

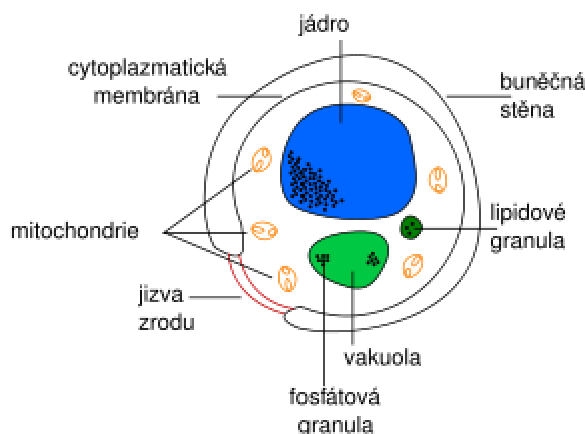
Mezi kvasinkami se nacházejí i kvasinky patogenní, které vyvolávají kožní, slizniční a jiná onemocnění. Negativní vliv má i nevhodný výskyt kvasinek (kontaminace při výrobním procesu).

Kvasinky žijí ve vodě, v půdě, na listech rostlin a na kazících se plodech. Ke svému životu potřebují vodní prostředí, kyslík a živiny. Většina kvasinek se množí a roste při teplotě od 0°C do 48°C. [9], [25]

2.1. Struktura kvasinky

Kvasinkové buňky mohou mít rozmanitý tvar. Obvykle kulatý nebo oválný, ale vyskytují se i jiné tvary (vejcovitý, lahvovitý, vláknitý, ...). Rozdíly můžeme najít i mezi buňkami stejného kmene, to závisí na okolním prostředí. Na obrázku vidíme strukturu kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* (široce využívané, například při výrobě piva, vína, chleba aj.).

S. cerevisiae jsou obecně tvaru rotačního elipsoidu s průměrem 5-10 μm na velké ose a 1-7 μm na menší ose. S věkem a opakovaným počtem dělení se buňka zvětšuje.

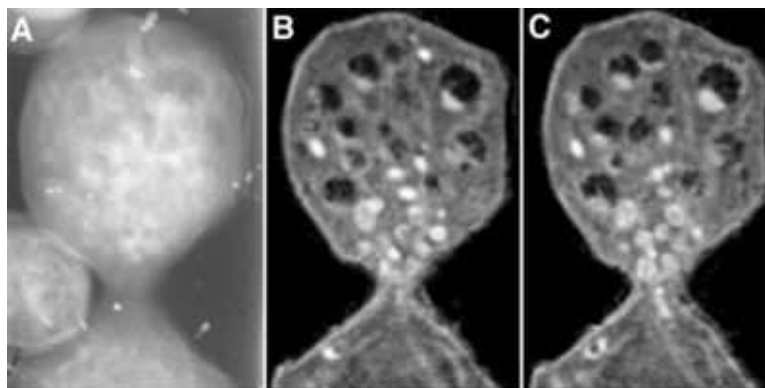


Obr. 21: Schéma buňky kvasinky. Převzato z [25].

Tvar buňky určuje buněčná stěna [6], [7], [8], která chrání kvasinku před vnějšími vlivy, především mechanickým a osmotickým šokem. Hlavní složkou buněčné stěny jsou polysacharidy. Díky chemickému složení má stěna záporný náboj. Tloušťka stěny je 150 nm – 400 nm.

2.2. Nepohlavní rozmnožování

Kvasinky se mohou rozmnožovat jak pohlavně (za vzniku pohlavních spor), tak nepohlavně a to většinou pučením.



Obr. 22: Pučící kvasinka. Převzato z [25].

Během pučení se na mateřské buňce vytvoří pupen, který se postupně zvětšuje. V oblasti pupene se hromadí sekreční měchýřky pro transport materiálu na stavbu buněčné stěny. Zúženina mezi mateřskou buňkou a pupenem se postupně uzavírá cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Dceřinná buňka se oddělí od buňky mateřské. Na místě oddělení vznikne u staré i nové kvasinky jizva. Celý tento proces trvá asi tři hodiny.

Podle místa, kde pupen na povrchu buňky vzniká rozlišujeme pučení monopolární, bipolární a multipolární. U monopolárně pučících kvasinek vzniká nová buňka vždy na stejném pólu mateřské buňky. U bipolárně pučících vzniká střídavě na obou pólech. Multipolárně pučící kvasinka může vytvářet pupeny kdekoli, ale nikdy ne na stejném místě.

Některé kvasinky jsou schopné za určitých okolností omezit rozmnožování a začít buňky prodlužovat.

2.3. Jizvy

Na buněčné stěně kvasinky vznikají mateřské jizvy po pučení dceřinných buněk a jejich oddělení. Jizva která po oddělení zůstane na dceřinné buňce se nazývá jizva zrodu a jelikož je z jiného buněčného materiálu, lze ji rozlišit od jizev vzniklých později dalším pučením.

Jizvy zůstávají na buňce po celý její vývoj. Kvasinka jich může mít víc, někdy se udává až 32. Podle počtu tedy můžeme určit relativní stáří buňky. Jizvy multipolárně pučících kvasinek jsou nejvíce prostudované u *S. cerevisiae*. Jak již bylo řečeno, mohou vznikat po celém povrchu mateřské buňky, nikdy však v místě už vytvořené jizvy. Nejdříve se objevují v místech největšího zakřivení stěny na pólu proti jizvě zrodu, další na pólu v blízkosti jizvy zrodu a poté v ekvatoriální rovině.

2.4. Růst kultury kvasinek

Rychlost rozmnožování kvasinek v médiu vyjadřuje růstová křivka. Lze ji rozdělit na 5 částí:

- Lag-fáze: Buňky se přizpůsobují novému živnému prostředí, získávají energii pro pučení a dělení. Počet buněk se nemění, ale roste jejich velikost. Tato fáze trvá několik hodin nebo může být tak krátká, že ji ani nepostřehneme. To závisí na přísunu živin.
- Exponenciální fáze: Je to období nejbunějšiho růstu. Dceřinné buňky se někdy oddělují aniž by dorostly do velikosti mateřské buňky. Proto se průměrná velikost kvasinek v této fázi snižuje. V pozdní exponenciální fázi buňkám začnou docházet živiny, zpomaluje se rozmnožování. Velikost buněk se už nemění.
- Diauxická fáze: Kvasinky vyčerpají glukózu z média a buňky rostou na jiných zdrojích uhlíku. Přírůstek buněčné hmoty je mnohem pomalejší a menší než v exponenciální části.
- Stacionární fáze: Nastává rovnováha mezi nově vzniklými a odumřelými buňkami. Tato fáze přichází po 5 až 7 dnech.
- Fáze odumírání: Růst buněk se postupně zastavuje a buňky začnou rychle odumírat.

Pro vyjádření koncentrace kvasinek v suspenzi se používá optická hustota OD. Světlo určité vlnové délky prochází vzorkem a je zeslabováno rozptylem na velkých buňkách. Pak

$$OD = -\log \frac{I_p}{I_d},$$

kde I_p je intenzita procházejícího světla, I_d je intenzita dopadajícího světla.

2.5. Průmyslový význam kvasinek

Využití kmenů *Sacharomyces cerevisiae* v průmyslových výrobních procesech lze rozdělit do tří skupin:

- Výroba alkoholických nápojů: Využívá se zde schopnosti kmenů anaerobně zkvašovat cukry v médiu na ethanol a oxid uhličitý.
- Výroba pekařského droždí: Probíhá za aerobních podmínek, kdy se využívá cukr přítomný v nízké koncentraci v živném prostředí a oxiduje na vodu a oxid uhličitý. Při praktické aplikaci droždí vznikající oxid uhličitý způsobuje kynutí, zatímco ethanol při pečení těsta vytěká.
- Výroba biomasy za účelem získání bílkovin: Biomasa se používá ke krmným účelům, jako doplněk lidské potravy a zdroj některých významných látek (ergosterol, enzymy, kofaktory).

3. Metody a materiály



Obr. 23: AFM v Ústavu makromolekulární chemie AV v Praze na Petřinách. [10]

3.1. Nastavení mikroskopu

Před měřením je třeba mikroskop nechat delší dobu zapnutý, aby se tepelně ustálil. V místnosti by měla být stálá teplota, bez vzdušných proudů a bez zbytečných vibrací (i když je mikroskop umístěn na antivibračním stole).

Po zapnutí přístroje se spustí ovládací program, kde je nutné nastavit, jaký skener budeme používat (jinak hrozí poškození skeneru). Skener v tomto mikroskopu pohybuje vzorkem. Lze vyměňovat skenery s různým rozsahem skenování v osách x , y .

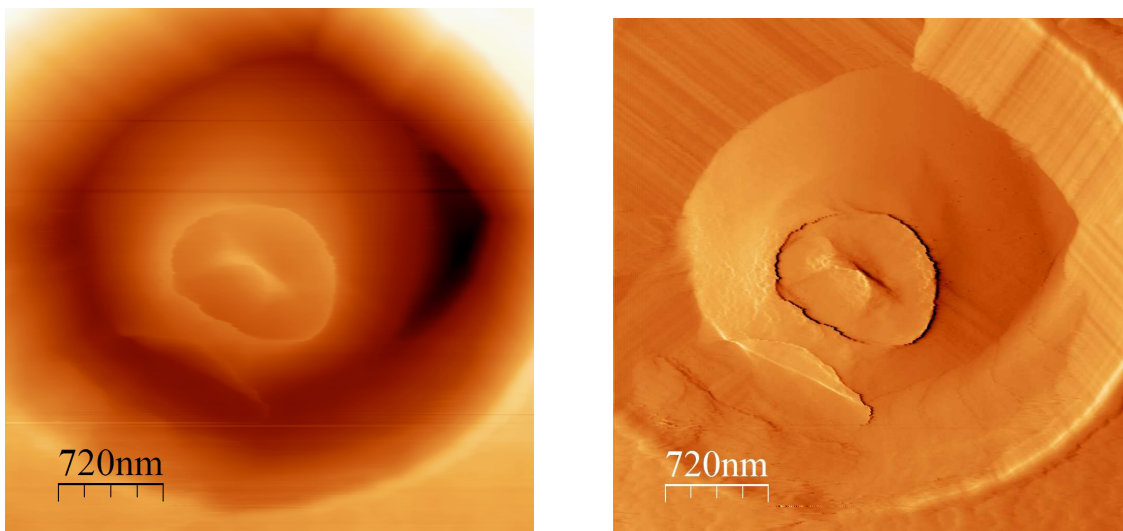
Do hlavy ustáleného mikroskopu vložíme vzorek a držák s hrotem. Nejprve musíme nastavit ručně, pomocí šroubů, laserový paprsek tak, aby dopadal na špičku ramínka hrotu a odrážel se do detektoru. Nastavování kontrolujeme optickým mikroskopem, který zobrazuje stopu paprsku na ramínku, a na displeji, kde vidíme výsledný signál (tj. celkový proud procházející fotodetektořem). Nedaří-li se získat silný signál, i když je laser vidět na ramínku, bude možná nutné pootočit zrcátkem.

Dalším krokem je vyvážení fotodetektoru. Hodnota na displeji dole udává rozdílový signál levo-pravý (napětí mezi levou a pravou částí fotodetektoru), hodnota nahoře rozdílový signál horo-dolní. Pomocí šroubu oba signály nastavíme co nejbližší nulové hodnotě. Dál se mikroskop ovládá počítačem.

Parametry pro skenování se nastavují na levém monitoru počítače (místo, velikost plochy, rychlost skenování, amplituda v z ose, přítláčná síla, ...). Lze také nastavit, zda se budou data zaznamenávat při pohybu hrotu zleva doprava nebo zprava doleva.

Na pravém monitoru se vykreslují dva obrázky. První topografický udává výšku hrotu nad vzorkem (vyšší oblasti světlé, nižší tmavé), druhý obrázek zobrazuje boční síly

vzorku na hrot (zobrazují se změny na povrchu vzorku, dostáváme vlastně derivační obraz).



Obr. 24: Topografický obraz (vlevo) a derivační obraz (vpravo).

Všechna měření byla provedena na přístroji AFM Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara USA) v kontaktním režimu s konstantní přitlačnou silou. Mikroskop je umístěn v laboratoři Ústavu makromolekulární chemie AV v Praze na Petřínách. Počítač snímá data při pohybu hrotu zprava doleva. Přitom byly použity hroty NP-S cantilever (oxide sharpened silicon nitride probe Digital Instruments).

Všechny zdrojové obrázky jsou uloženy na přiloženém CD.

3.2. Zpracování obrázků

Ke zpracování naměřených dat byl použit softwarový program WSxM 4.0 Develop 11.4. Kromě výřezu (zoom) jsem používala následující softwarové úpravy:

- Plane: Obrázkem se proloží rovina, která se následně odečte. Takto lze odstranit nechtěný náklon vzorku. Snímek se přitom nezdeformuje. (Je možné odečítat i plochu vyššího řádu, tato úprava ale není nikde použita.)
- Flatten: Každým řádkem se proloží křivka vyššího řádu, přičemž se bere ohled na polohu okolních řádků. Je vhodná tam, kde je vidět výrazná struktura řádkování. Ale (Pozor!) může podstatně zdeformovat naměřený povrch. Na druhou stranu v některých případech zviditelní jemné detaily, které v řádkování zanikají. Použila jsem tuto úpravu tedy jen tam, kde se po její aplikaci nezměnil podstatně tvar kvasinky a zároveň vynikly detaily na povrchu.
- 3D: Téměř všechny snímky jsou převedené do prostorového zobrazení. Při zpracování obrazu je dále možné volit různé osvětlení povrchu, tak, aby působil co nejplastičtěji. Většinou je na ose z zvoleno stejné měřítko jako na vodorovných osách. V některých případech je osa z zvýrazněna.
- V programu je možné určovat různé parametry zobrazeného povrchu vzorku. Například lze vykreslit profil povrchu vzorku podél libovolného řezu a z něho pak odečítat potřebné hodnoty (výšku výběžků, poloměry křivosti kvasinek atd.).

3.3. Použité kvasinky

Všechny použité kvasinky byly rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky připravovala standardními postupy paní Iva Benešová ve Fyzikálním ústavu UK. Buňky rostly v tekutém YEP médiu (2% kvasničného extraktu, 1% peptonu) v třepací lázni o teplotě 30°C po dobu několika hodin (obvykle 24h). Poté byla narostlá kultura buněk vyjmuta z třepací lázně a třikrát centrifugována při 2000 otáčkách za 1 min po dobu 2 min. Usazené buňky byly mezi odstředováním vždy promyty destilovanou vodou. Optická hustota suspenzí kvasinek (OD) byla měřena na přístroji Novaspec II (Biochrom Ltd. Cambridge).

Kvasinky s různým množstvím MDR pump: MDR pumpy jsou membránové proteiny, které aktivně odstraňují cizorodé látky z buněk a tím zajišťují odolnost buněk vůči chemickému stresu. Různé kmeny kvasinek obsahují různé druhy a množství MDR pump. Pro měření jsme použili kmeny AD 1-3, US a IL. Kmen AD 1-3 je kmen mutantní, jehož membrány neobsahují pumpy č. 1, 2, 3. Buňky rostly v médiu s přísadkou glukózy. Podle množství glukózy přidané do média vzniknou:

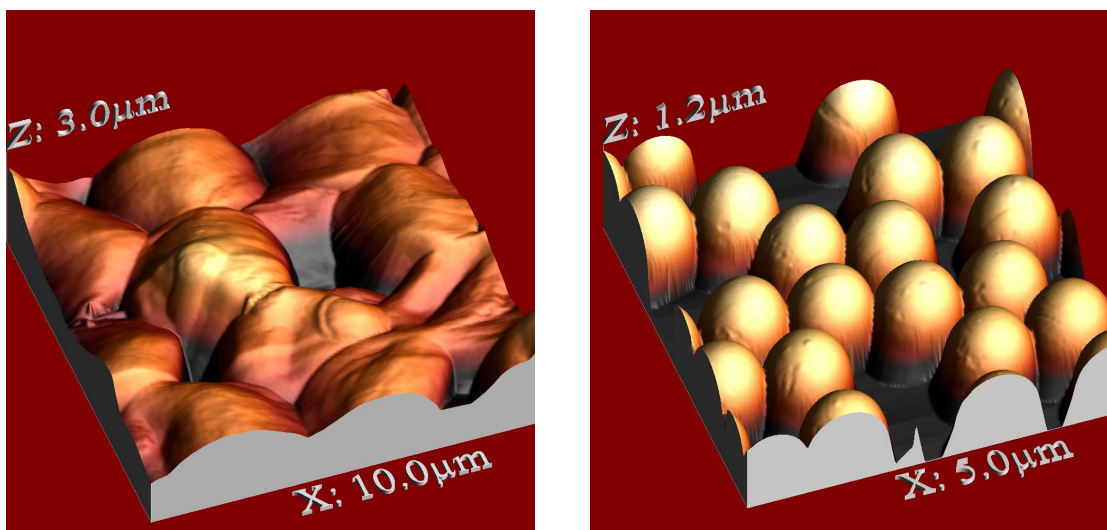
- buňky s dobře vyvinutou stěnou (HG – high glucose) ...0,5 ml 40% glukózy do 10 ml YEP média
- buňky s tenkou stěnou (LG – low glucose) ... 0,05 ml 40% glukózy do 10 ml YEP média

Každý ze tří kmenů byl naměřen ve dvou variantách: LG a HG. Hodnota OD se pohybovala kolem 3 až 4.

Kvasinky různého stáří: Dále byly snímány kvasinky kmenů JC 482A (označovány jako #013) a AD-JC 488A (označovány jako #015) v různých fázích růstové křivky, tedy různě starých kvasničných kultur (1 den, 2 dny, 5 dní). Kmen #015 je s mutací na genu RAS. Tato mutace způsobuje rychlejší stárnutí kvasinky. Kmeny poskytla Doc. Ing. Alena Píchová CSc. OD se pohybovalo kolem hodnoty 5.

3.4. Příprava vzorků

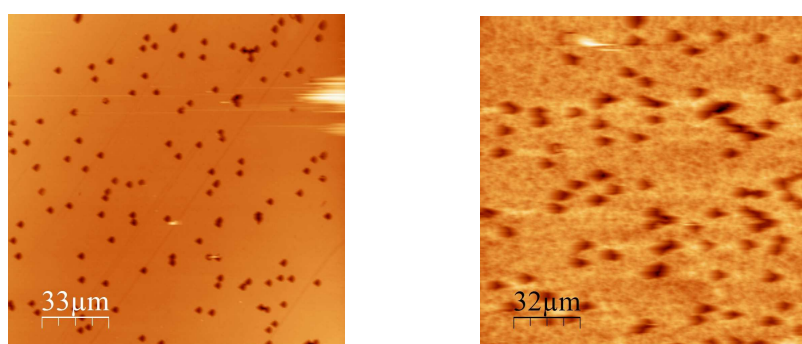
Suchý vzorek: Kapku vodního roztoku kvasinek jsem nechala uschnout na sklíčku. Sklíčko se lepící páskou připevní na kovovou podložku, která se vloží do hlavy mikroskopu na magnet. Tím je vzorek připraven k měření. Poté se do hlavy připevní držák s hrotem. V tomto případě jsem použila k měření pokleповý režim. Rychlost skenování byla 4 $\mu\text{m/s}$. Vytvořit jeden snímek tak trvá až 20 minut.



Obr. 25: Suchý vzorek kvasinek (vlevo) a latexové kuličky průměru 1 μm (vpravo).

Vzorek ve vodě

Uchycení do filtru: Jednou z možností, jak uchytil kvasinky na podložku, aby šly snímat ve vodě v kontaktním režimu, je uchytil je do speciálního filtru (membrány). Použila jsem hydrofilní polykarbonátové membrány s póry o průměru 5.0 μm - Isopore disc PC philic 5.0μm (Millipore Corp., USA). Jedna strana filtru je hladká (ta, z které se otvory nastřelovaly), druhá drsná. Otvor má tvar trychtýře, který je na drsnější straně větší a na hladké užší. Filtrem se prostříkne směrem z drsné strany roztok s kvasinkami, přičemž některé se zachytí v otvorech. Prostříknutí se provádělo extruderem LiposoFast (Avestin Inc., Canada). Místo prostříknutí roztoku skrz filtr je možné postup následovně zjednodušit. Filtr položíme na podložní sklíčko a kápneme na něj kvasinkový roztok, který se sám „vsákne“ do filtru. V otvorech se zachytí srovnatelné množství buněk. Filtr se lepící páskou připevní na podložku (velikost vzorku asi 0,5 cm x 0,5 cm) a vloží do mikroskopu. Je tu ještě otázka, z které strany filtru máme skenovat. Výhodnější se zdá být pozorování na drsné straně, protože při skenování na hladké straně často hrot kvasinku zatlačí a ta vypadne.

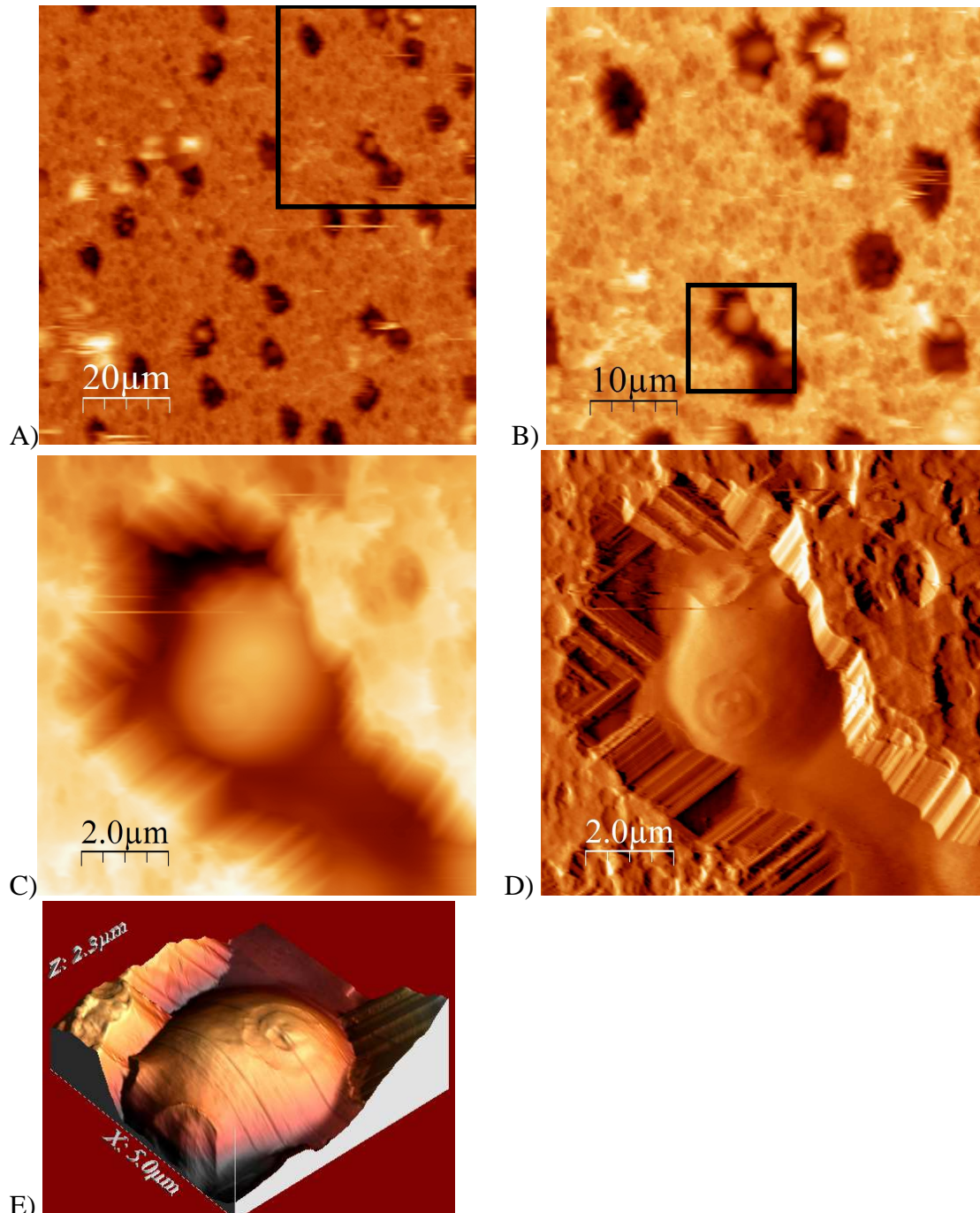


Obr. 26: Hladká strana filtru (vlevo) a drsná strana filtru (vpravo).

Když máme vzorek připravený, vložíme do mikroskopu držák s hrotem pro vodní prostředí. Stříkačkou kápneme na vzorek destilovanou vodu, přičemž musíme pečlivě sledovat, aby se voda nedostala mimo vzorek a nenatekla do mikroskopu. Poté nastavíme laser. Během měření doplňujeme vodu. Kdyby totiž vyschla, paprsek už by nedopadal na detektor, ztratili bychom tak signál a mohl by se snadno zlomit hrot.

Při kontaktním režimu můžeme použít vyšší skenovací rychlost než v poklepovém. Používala jsem frekvenci 2 Hz při největší ploše 160x160 μm . Vytvoření obrazu trvá v tomto případě asi 5 minut.

Problém nastává při hledání kvasinek, které uvízly ve filtru. Při tak malém rozsahu skeneru se často musí mnohokrát změnit poloha vzorku, než objevíme vhodnou kvasinku. Hrubý posuv skenovací oblasti se uskutečňuje manuálně dvěma šrouby. Na následujících obrázcích je vidět postup při hledání a postupném přibližování kvasinky.



Obr. 27: Snímky A, B, C znázorňují postupné přibližování kvasinky (kmen US, HG) zachycené ve filtru. D je derivační obraz. E je trojrozměrný obraz vytvořený z topografického snímku C.

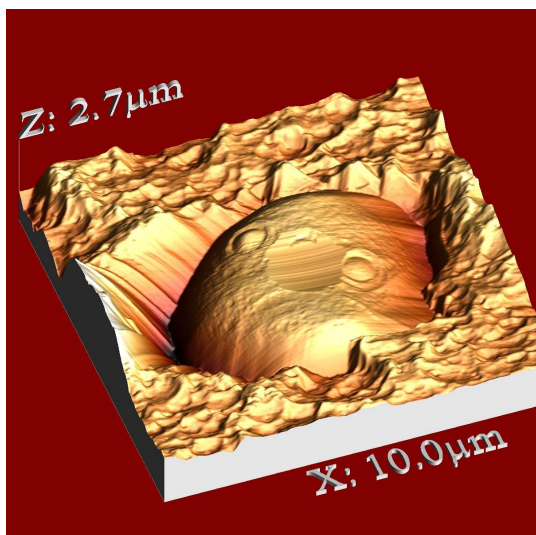
Uchycení na sklíčko: Dalším způsobem, jak zafixovat buňky na podložku, je využít jejich záporně nabitě stěny a uchytit je na kladně nabitě sklíčko. Takto se podařilo vytvořit několik snímků za použití sklíček SuperFrost® Plus (Menzel GmbH & Co KG). Úchyt ale nebyl tak pevný jako ve filtru. Hrot často kvasinky při skenování odsunul nebo je zachytil.

4. Výsledky měření a diskuze

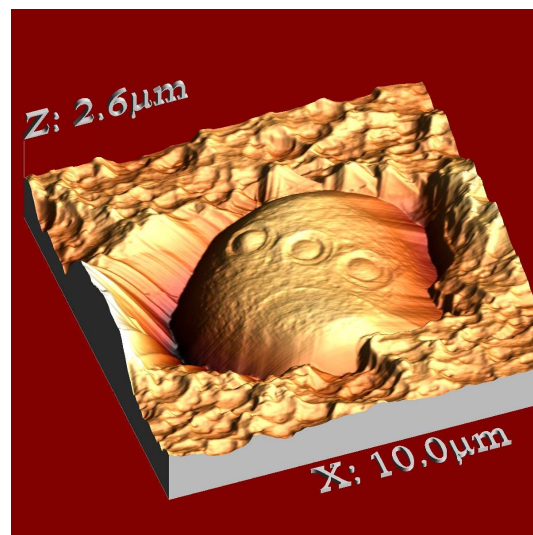
4.1. Artefakty

Jak již bylo popsáno v 1. kapitole, vznikají při měření na AFM z nejrůznějších důvodů v obrázcích artefakty. I při mém měření artefakty vznikaly. Některé z nich jsou uvedeny v této kapitole.

Na obr. 28 je snadno rozpoznatelný artefakt v podobě plošky na vrchu kvasinky. Artefakt vznikl tím, že v místě plošky přesahoval vzorek maximální skenovatelnou výšku Skener se nacházel v krajní poloze). To, že se nám ploška jeví mírně prohnutá, je způsobeno následnou úpravou snímku procedurou *flatten*. Obr. 29 bez artefaktu byl pořízen po následném oddálení a přiblížení hrotu.



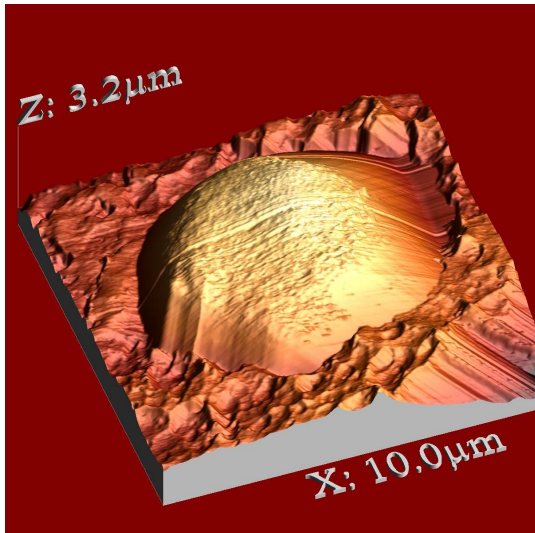
Obr. 28: kmen #015, 1 den



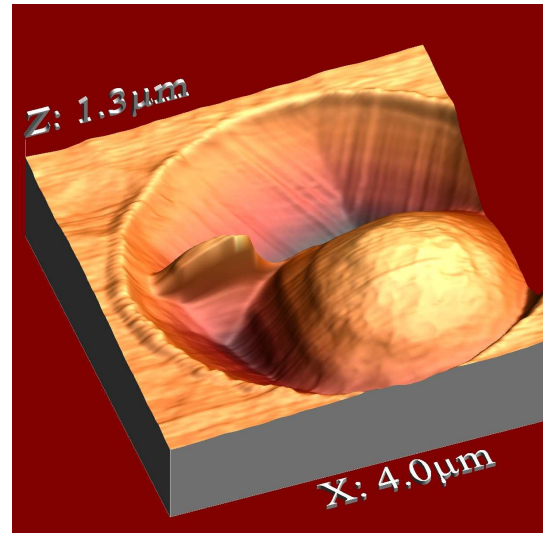
Obr. 29: kmen #015, 1 den

Na obr. 30 se ztrácí na okrajích kvasinky struktura, což může být způsobeno geometrií hrotu. V těchto místech je povrch kvasinky zvrásněn a je nejspíš téměř kolmý k podložce, hrot pak nemůže takový tvar přesně kopírovat. Další možné vysvětlení je, že hrot za sebou povrch kvasinky chvíli „táhne“ (na obrázku se to projevilo hladkou částí vpravo).

Hrana vzniklá na zadní stěně póru filtru na obr. 31 je důsledkem „zrcadlení hrotu“, hrot se v té části opíral svojí hranou o zadní stěnu póru.

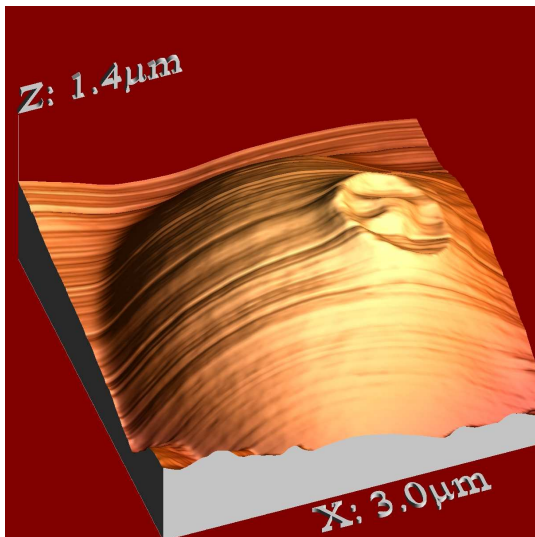


Obr. 30: : kmen #015, 5 dní

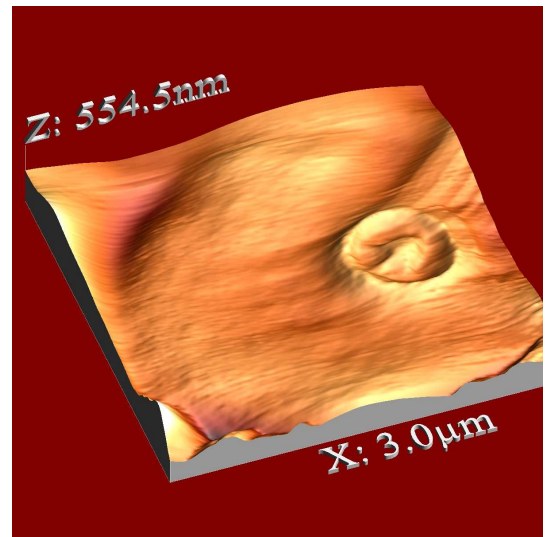


Obr. 31: kmen IL, HG

Deformace tvaru kvasinky na obr. 32 nevznikla měřením, ale softwarovou úpravou *flatten* obrázku 33. Tato úprava zároveň potlačila efekt řádkování, čímž vynikly detaily na povrchu kvasinky.

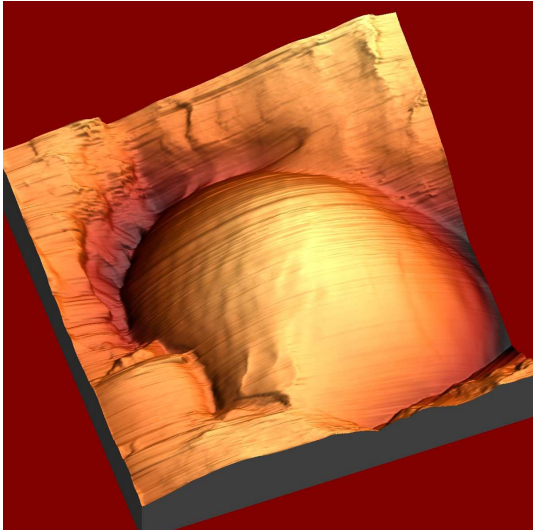


Obr. 32: kmen US, LG

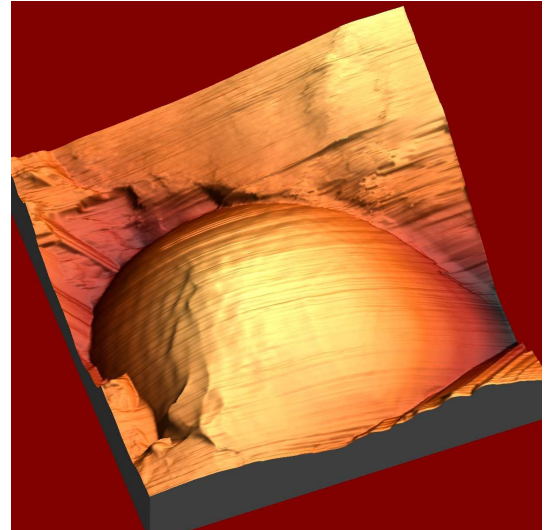


Obr. 33: kmen US, LG

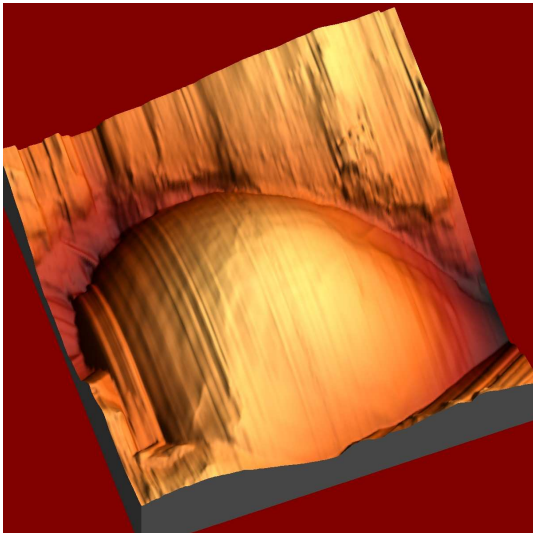
Obrázky 34 až 37 byly nasnímány bezprostředně za sebou, přičemž u každého byl nastaven jiný směr skenování. Z výsledků je patrné, že tím není zásadně ovlivněn tvar povrchu. Zároveň lze tuto sérii čtyř obrázků lišících se pouze ve směru, kterým se pohyboval hrot, brát za míru odolnosti kvasinky vůči vzniku artefaktů spojených s mechanickým kontaktem kvasinky s hrotem. Maxima na osách byla: $x = y = 7 \mu\text{m}$, $z = 2,1 \mu\text{m}$.



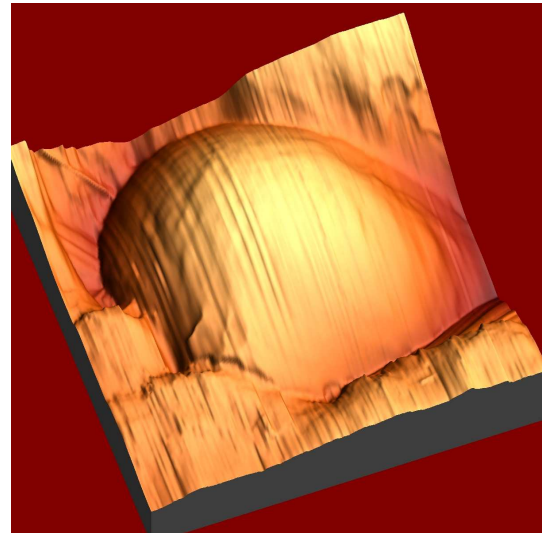
Obr. 34: Zprava (kmen #013, 1 den)



Obr. 35: Zleva



Obr. 36: Zdola

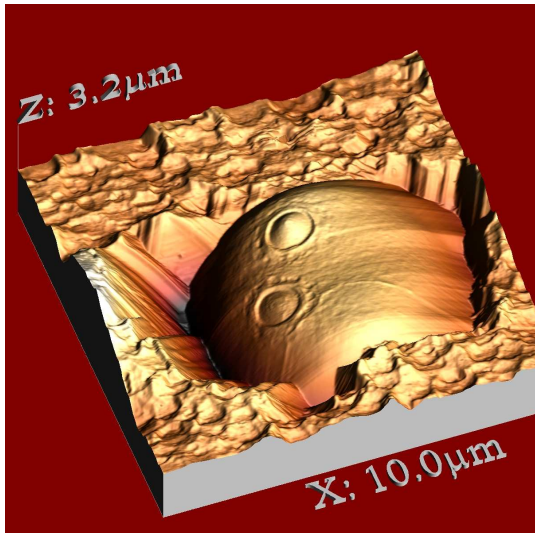


Obr. 37: Shora

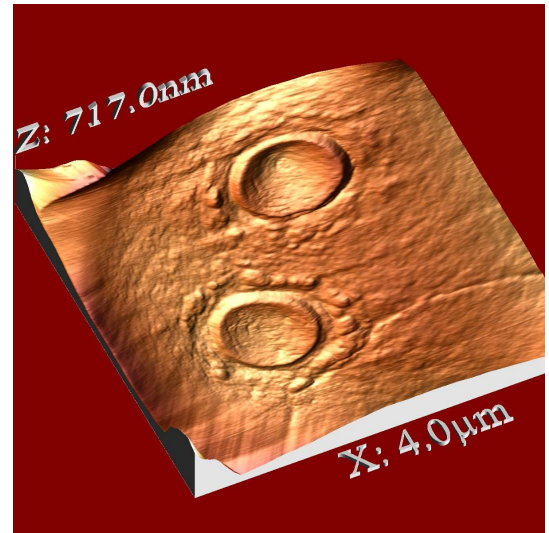
4.2. Zobrazení jizvy

Metodou AFM lze s vysokým rozlišením detaily buněčné stěny, jako jsou jizvy po pučení kvasinek. Přitom obvyklý průměr jizev byl 800 nm, jejich středy a okraje jsou vystouplé do výšky kolem 50 nm až 100 nm. Na obrázcích 38 až 41 je zobrazena kvasinka se dvěma jizvami při postupném přibližování horní jizvy. Tvar jizvy se s věkem kvasinky mění, příklady jizev jdou vidět na obr. 38 až 44. Na obr. 43 je vlevo vidět jizva na starší kvasince, jejíž rysy už nejsou tak zřetelné.

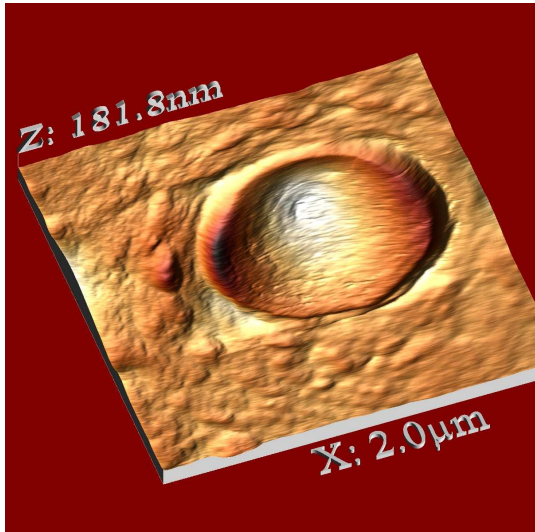
Na obr. 45 je s největší pravděpodobností zachycena pučící kvasinka.



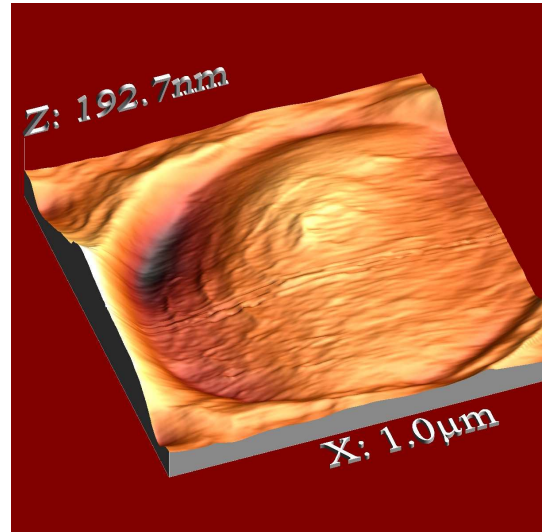
Obr. 38: kmen #013, 2 dny



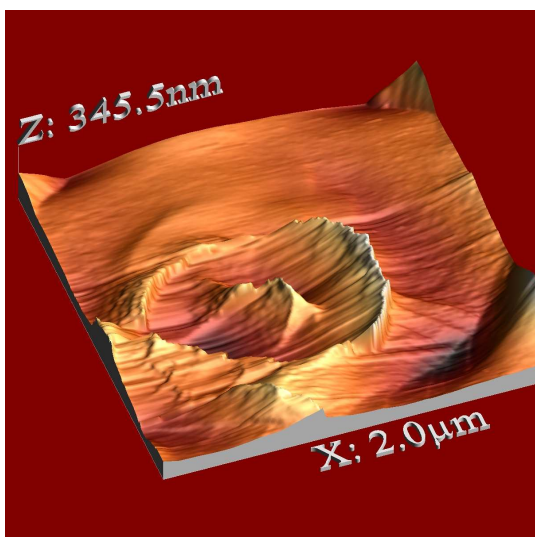
Obr. 39: : kmen #013, 2 dny



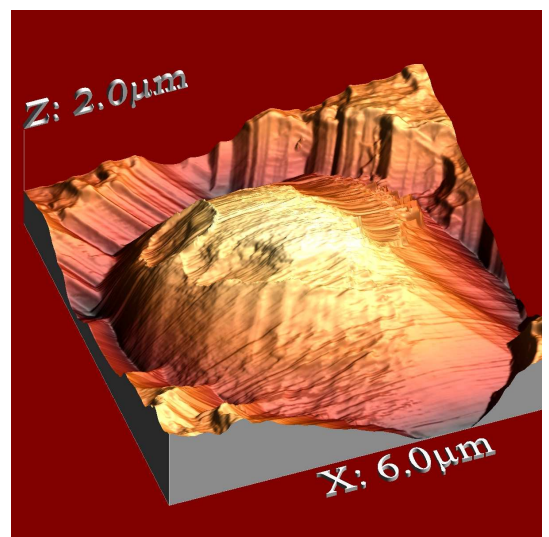
Obr. 40: kmen #013, 2 dny



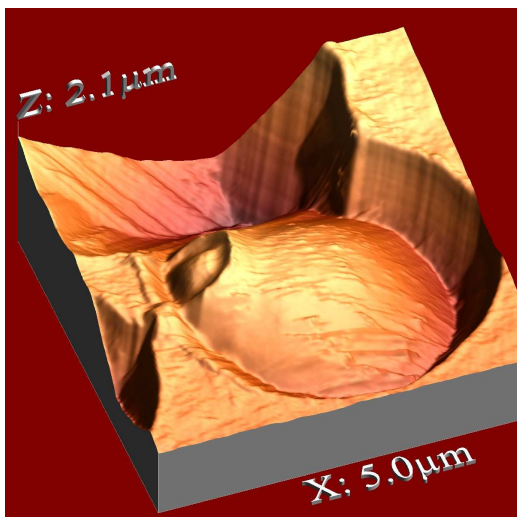
Obr. 41: kmen #013, 2 dny



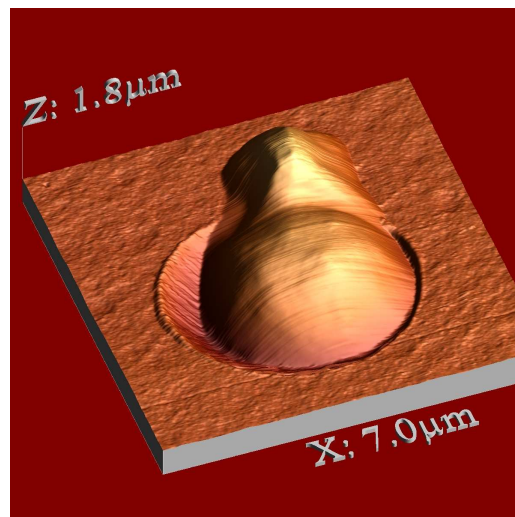
Obr. 42: kmen US, LG



Obr. 43: kmen #015, 5 dní



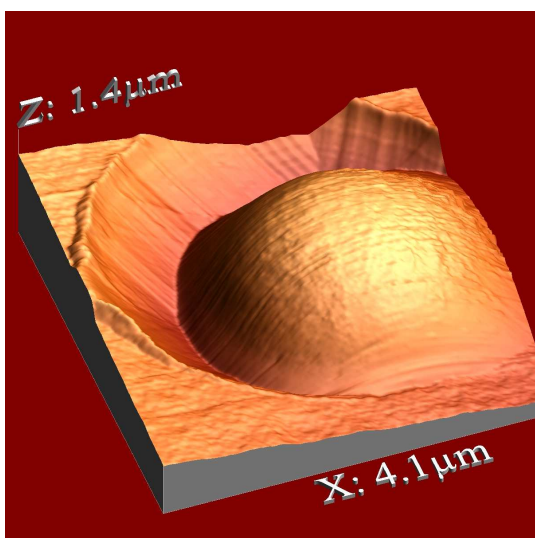
Obr. 44: kmen US, HG



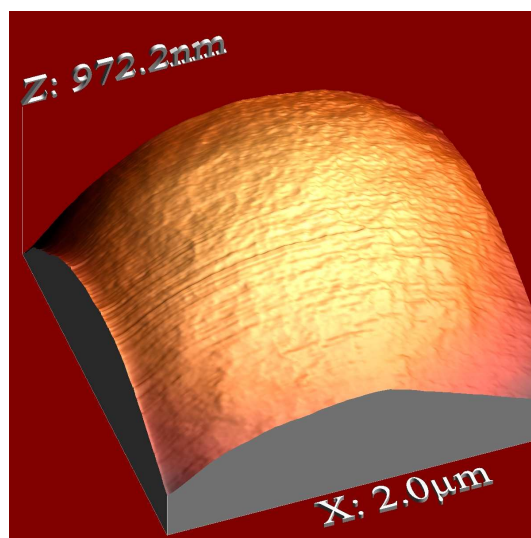
Obr. 45: kmen US, HG

4.3. Vizualizace povrchu kvasinek s různým množstvím MDR pump

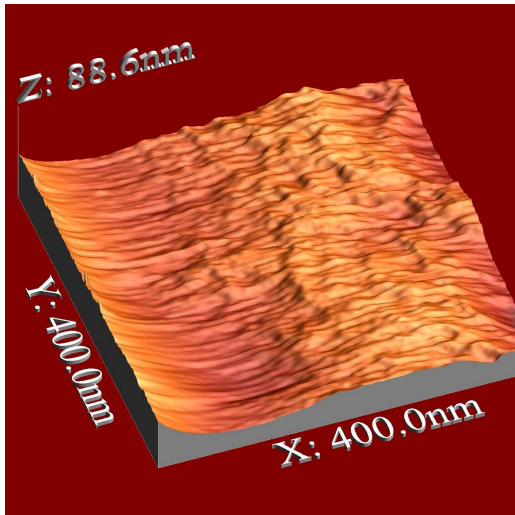
Na obr. jsou zachyceny nejtypičtější případy kvasinek kmenů AD 1-3, IL a US pěstovaných při nízké (LG) a vysoké (HG) koncentraci glukózy. Z naměřených dat nelze prokázat vliv LG a HG na povrch buněčné stěny kvasinek uvedených kmenů. Problém s určováním charakteristických rysů jednotlivých skupin je především v malé četnosti zachycených kvasinek. Z takového statistického vzorku nelze vyvodit obecné závěry. Všechny povrchy vykazují výběžkovitou strukturu podobnou pomerančové kůře. Výška výběžků se pohybuje od 2 nm do 20 nm. Příčinou těchto výběžků a prohlubní může být různá tuhost povrchu (v místech prohlubní měkčí, v místech výběžků tvrdší). Nerozlišíme, zda se jedná o skutečnou topologii povrchu, nebo je to způsobeno odlišnými mechanickými vlastnostmi. Podle snímků s elektronového mikroskopu, kde jsou na povrchu také vidět nerovnost, můžeme předpokládat, že na povrchu kvasinek opravdu jsou výběžky.



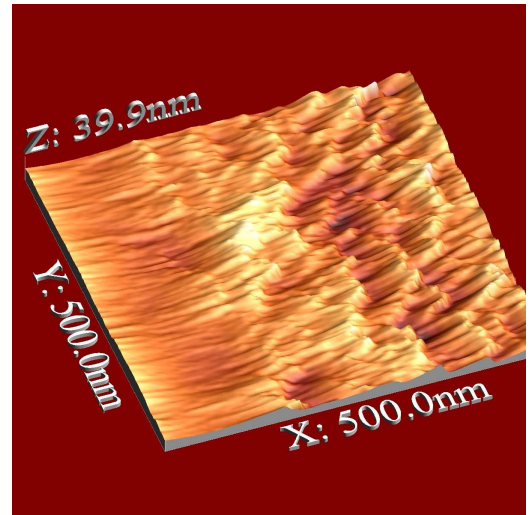
Obr. 46: kmen AD 1-3, LG



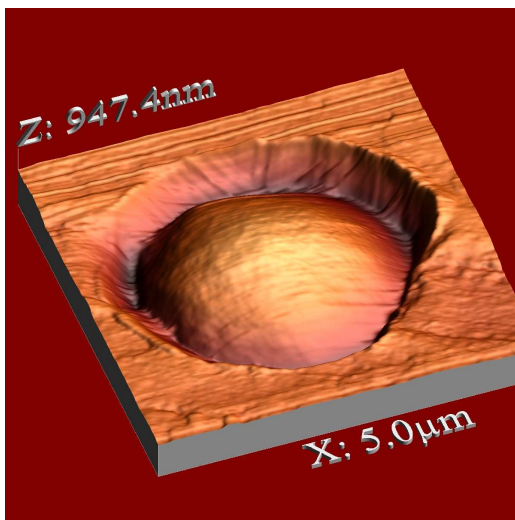
Obr. 47: kmen AD 1-3, HG



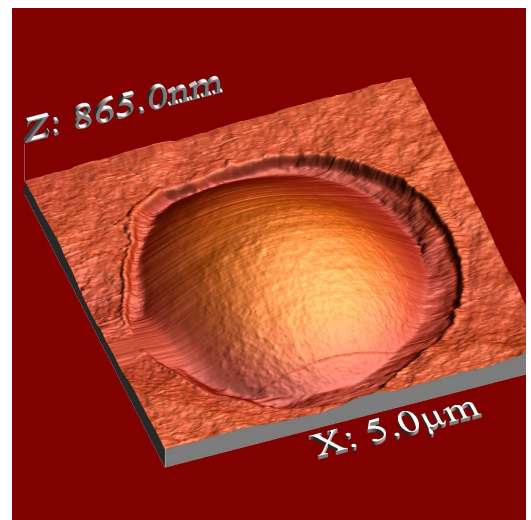
Obr. 48: kmen AD 1-3, LG



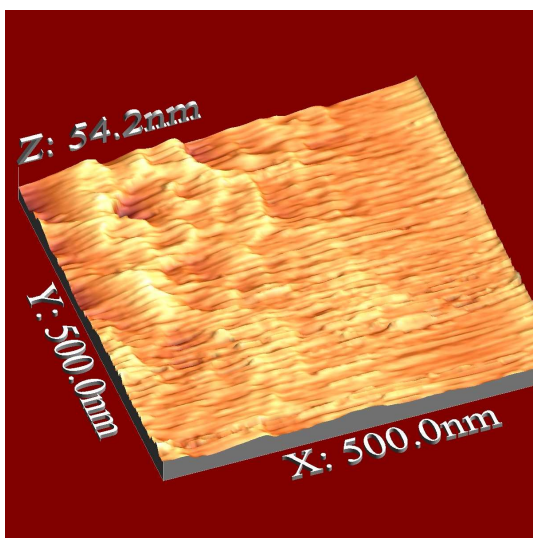
Obr. 49: kmen AD 1-3, HG



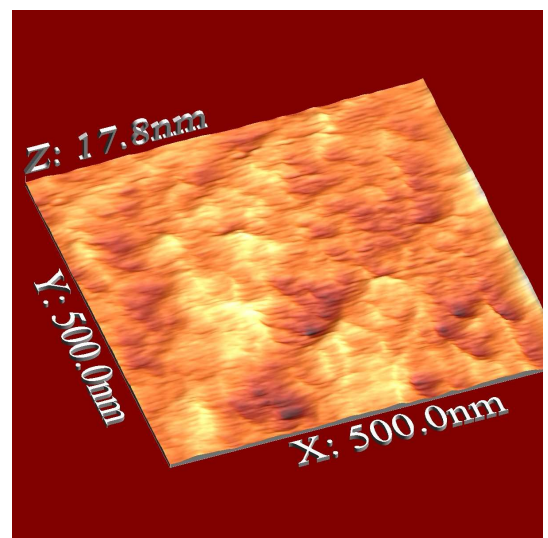
Obr. 50: kmen IL, LG



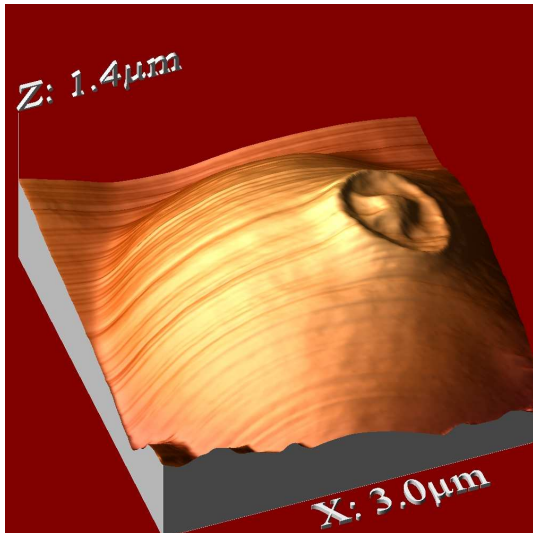
Obr. 51: kmen IL, HG



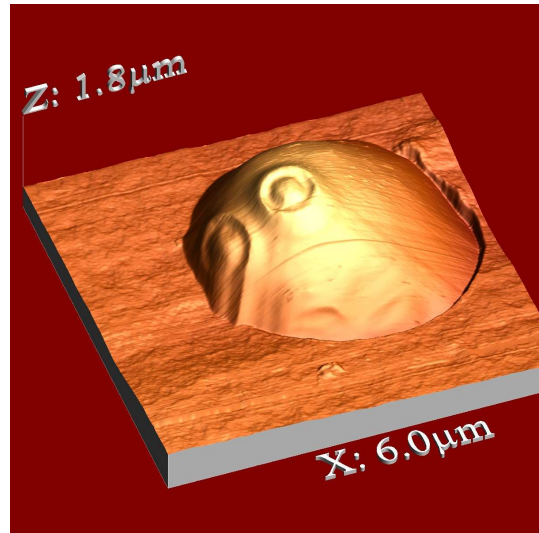
Obr. 52: kmen IL, LG



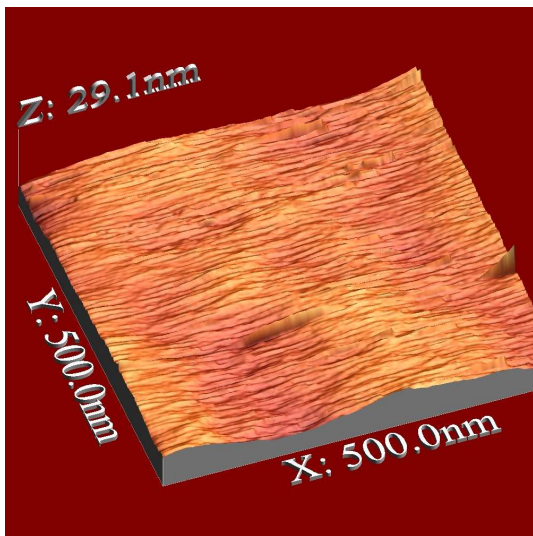
Obr. 53: kmen IL, HG



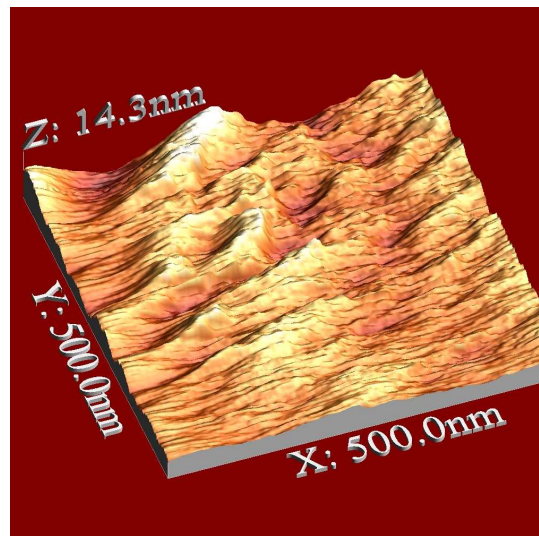
Obr. 54: kmen US, LG



Obr. 55: kmen US, HG



Obr. 56: kmen US, LG

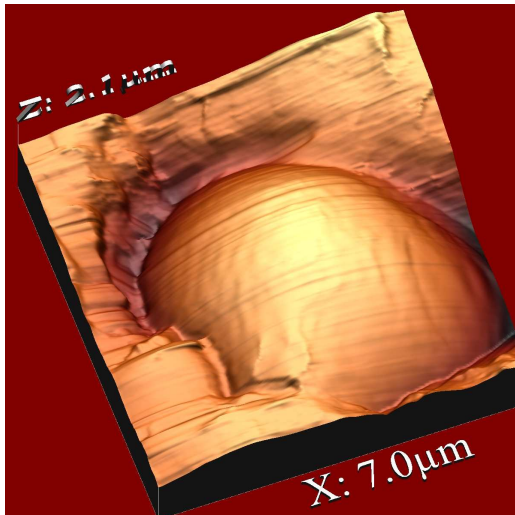


Obr. 57: kmen US, HG

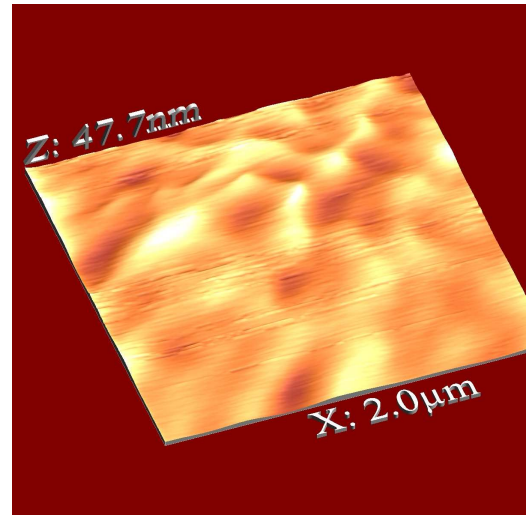
4.4. Rozdíly buněčných stěn reprodukčně mladých a starých kvasinek

Na následujících obrázcích jsou kvasinky kmene #013, #015 různého stáří (1 den, 2 dny, 5 dní). Mezi jednodenními a dvoudenními nejsou viditelné rozdíly. U pětidenních je pozorovatelné výrazné zvrásnění a větší výběžky. Zároveň se prudce zvyšuje výskyt artefaktů, což je zřejmě způsobeno změnou kvality stěny (menší pevnost, mechanické porušení, změna pružnosti). Kvasinka na obr. 67 zcela postrádá obvyklou strukturu, což by mohlo znamenat, že je tam stěna porušena či dokonce chybí. Často se zdálo, jako by při skenování hrot rozrýval povrch stěny.

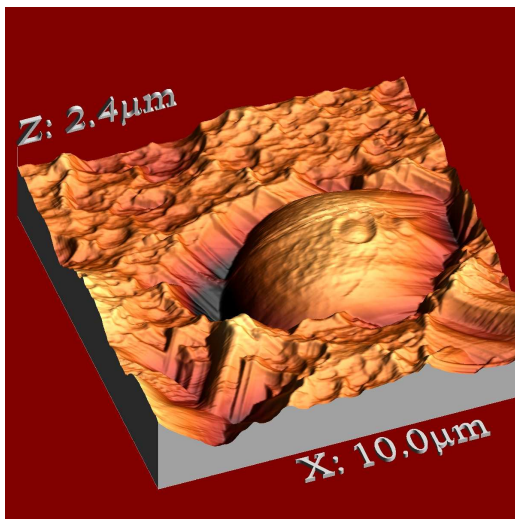
Na obr. 68 je patrný stejný artefakt, jako již popsáný v obr. 28.



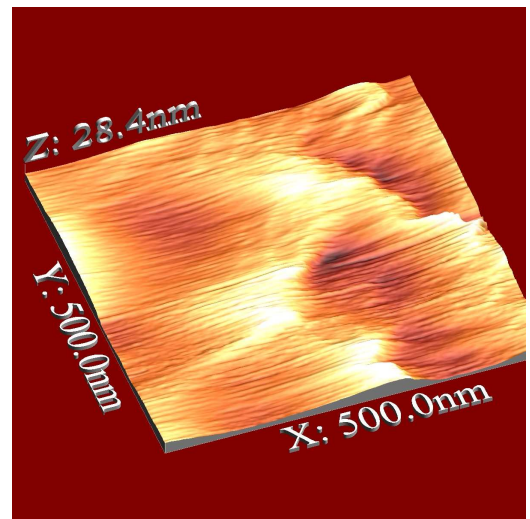
Obr. 58: kmen #013, 1 den



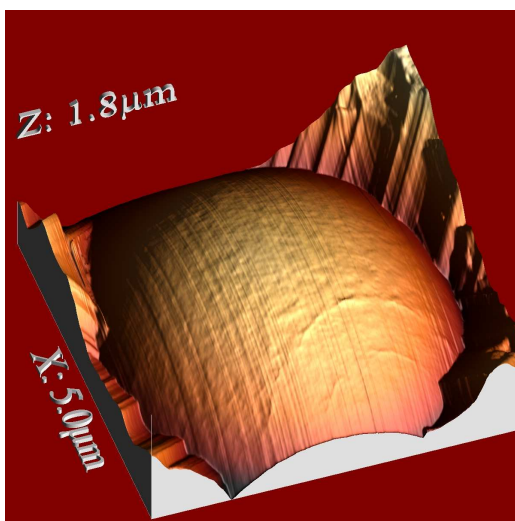
Obr. 59: kmen #013, 1 den



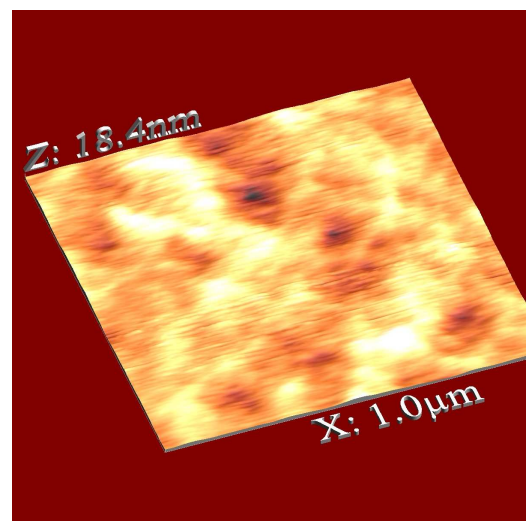
Obr. 60: kmen #015, 1 den



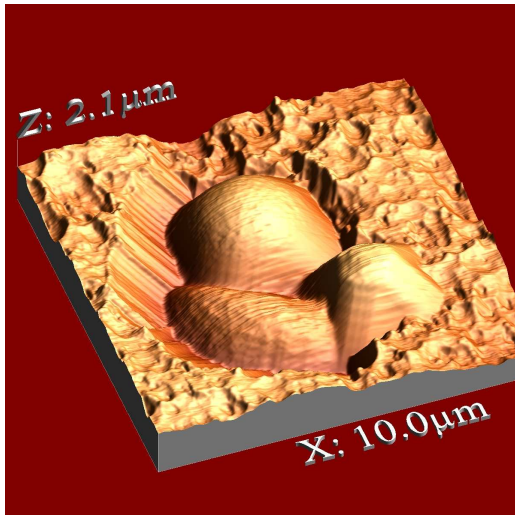
Obr. 61: kmen #015, 1 den



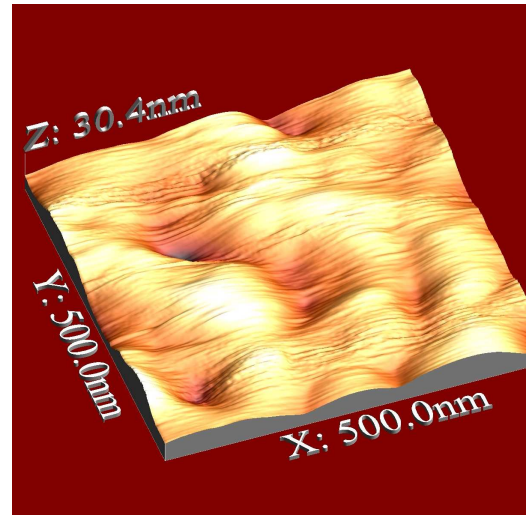
Obr. 62: kmen #013, 2 dny



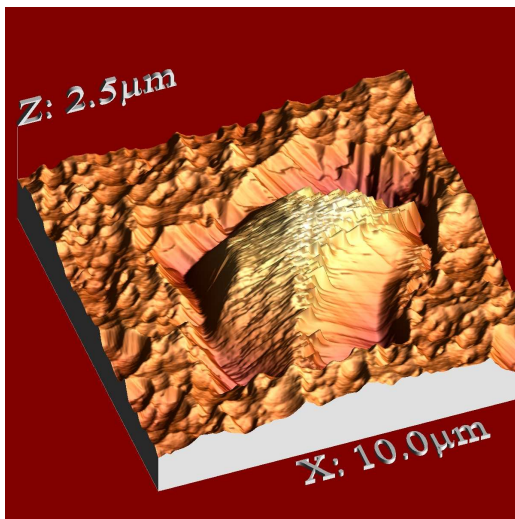
Obr. 63: kmen #013, 2 dny



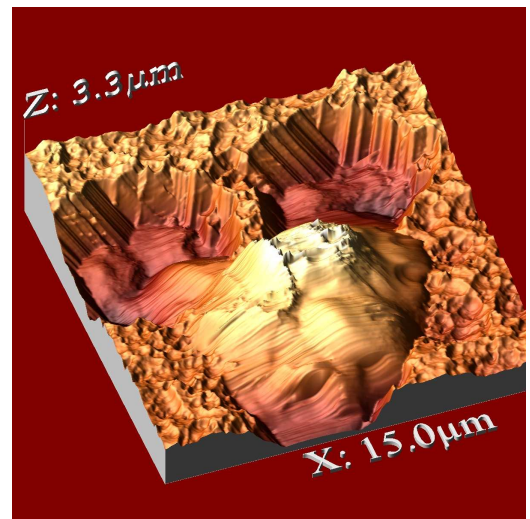
Obr. 64: kmen #015, 2 dny



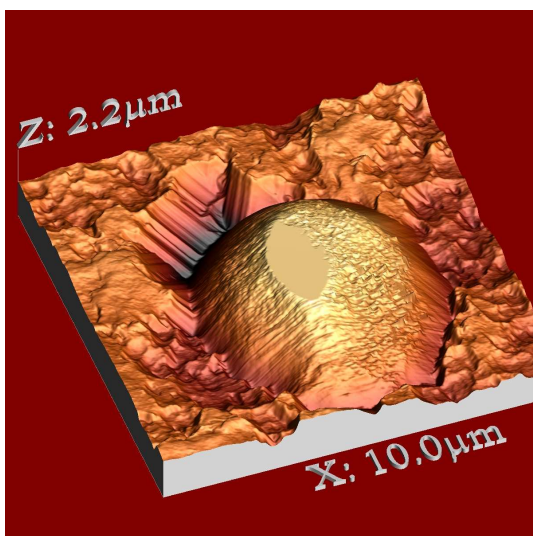
Obr. 65: kmen #015, 2 dny



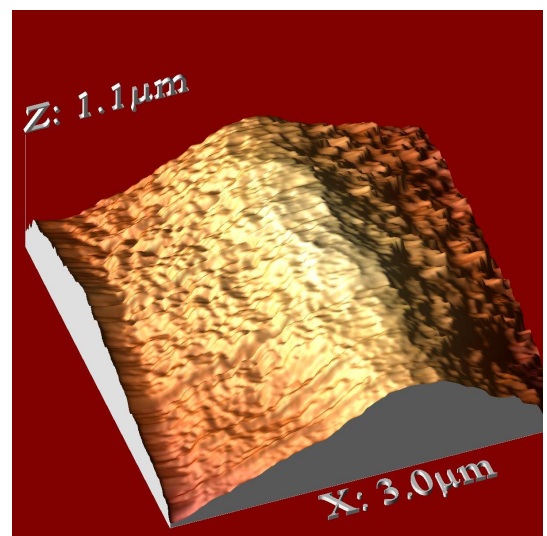
Obr. 66: kmen #015, 5 dní



Obr. 67: kmen #015, 5 dní



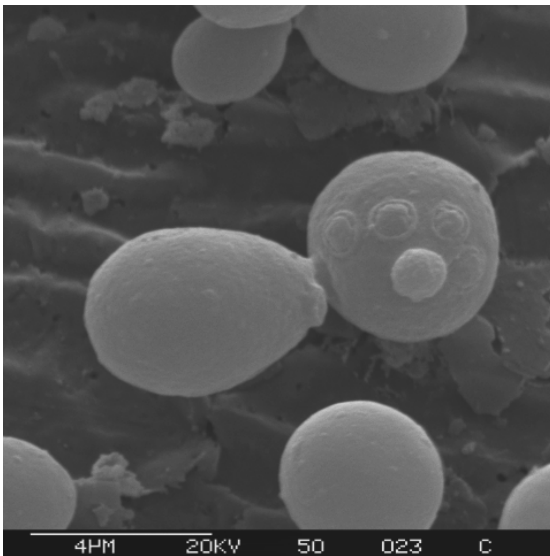
Obr. 68: kmen #015, 5 dní



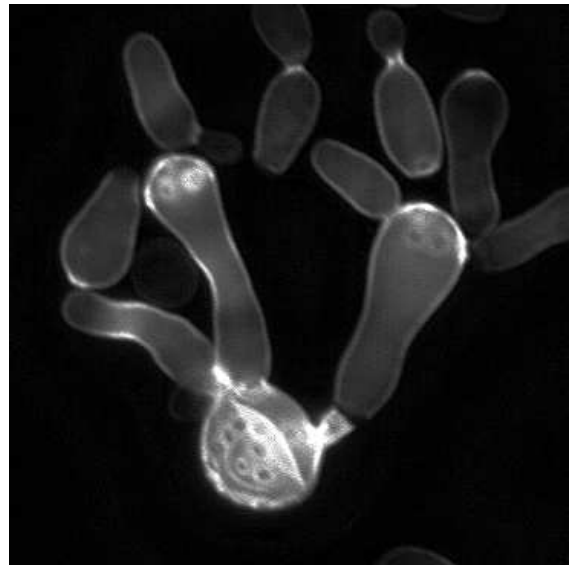
Obr. 69: kmen #015, 5 dní

4.5. Ukázky zobrazení kvasinek jinými mikroskopickými metodami

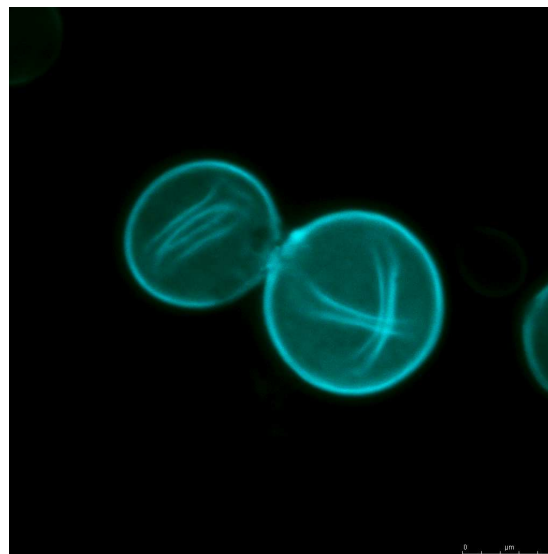
Obrazy kvasinek se běžně získávají jinými mikroskopickými metodami než AFM. Příklady takových zobrazení jsou na obrázcích 70 až 72. Na obr. 71 vidíme relativně starou kvasinku s mnoha jizvami. Na ní pučí další kvasinky, které ale nemají sílu se oddělit a jejich tvar se prodlužuje. Na mateřské buňce je dobře viditelný světlý pruh, připomínající zvrásnělou (zkrabacenou) buněčnou stěnu. Podobný efekt lze pozorovat na kvasinkách z obr. 72. Tyto úkazy se dobře shodují s výsledky měření metodou AFM, kdy stěny pětidenních kvasinek vykazovaly podobné defekty. Schodovité výběžky by mohly odpovídat vráskám z obr. 72. Předpokládá se, že stěna stárnoucí kvasinky se časem začíná loupát, což by zase mohlo být důvodem, proč se během skenování starých kvasinek často měnil tvar povrchu a hrot jejich povrch rozrušoval.



Obr. 70: Zobrazení elektronovým mikroskopem



Obr. 71: Zobrazení fluorescenčním mikroskopem



Obr. 72: Zobrazení konfokálním mikroskopem, buňky barvené calcofluorem

5. Závěr

Podářilo se získat pomocí AFM zdařilé obrázky kvasinek. Největším problémem bylo uchytit kvasinky na pevnou podložku. Při použití filtru můžeme měřit pouze kvasinky náhodně zachycené do pórů, což znemožňuje systematické sledování nějaké dané charakteristiky nebo vybírání konkrétního typu kvasinek. Můžeme se ale držet poznatků získaných jinými druhy mikroskopie, a tak snadněji interpretovat některé pozorované jevy.

- Vliv koncentrace glukózy v živném médiu na povrchovou strukturu buněčné stěny kvasinek se nepovedlo prokázat. Důvodem je malé množství naměřených dat, z kterých zatím nelze vyvodit obecné závěry.
- Byly odhaleny některé artefakty vznikající při měření na AFM a při zpracovávání obrazu v příslušném programu, což nám dále umožňuje lépe odhalit, zda nesledujeme „falešný“ útvar v topografii vzorku.
- Během měření bylo detailně zobrazeno množství jizev na stěnách kvasinek různých kmenů. Vyskytly se jizvy odlišných tvarů, velikostí a různého stáří, přičemž rysy starších jizev byly méně patrné.
- Při porovnávání kvasinek mladých (jednodenních) a starých (pětidenních) se ukázalo, že buněčná stěna vykazuje známky stárnutí. Povrch stěny je hrubší, hrbolatější, vznikají na něm schodovité výběžky, které jsou pravděpodobně známkou existence vrásek pozorovaných ve fluorescenčních mikroskopech. Z pořízených AFM snímků můžeme usuzovat na to, že se stěna v některých místech odlupuje.

Získané výsledky budou využity pro další výzkum buněčné stěny kvasinek metodou AFM. Zjistili jsme, že i pro měření měkkých vzorků kvasinek můžeme použít kontaktní režim, v kterém jsme získali poměrně rychle kvalitní obrázky. V dalším měření by se mohlo v některých případech použít nekontaktního režimu nebo režimu pokleповého, konkrétně u povrchů starších kvasinek, jejichž stěna se zdá být měkkší. Měření v těchto režimech je mnohem pomalejší, proto bylo výhodné vytvořit přehled snímků nejdříve v režimu kontaktním.

Literatura

- [1] Kubínek R., Vůjtek M., Mašláň M. (2003): Mikroskopie skenující sondou. Katedra experimentální fyziky, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc
- [2] Weber J., Janda P.(1998): Mikroskopie atomárních sil. *Československý časopis pro fyziku* **48**, 196-204
- [3] Weber J., Janda P.(1998): Mikroskopie rastrovací sondou. *Vesmír* **77**, 381-384
- [4] Frank L., Král J. (2002): Metody analýzy povrchů – Iontové, sondové a speciální metody. Academia, Praha
- [5] Janda P. (2002): Rastrovací sondové mikroskopie v elektrochemii. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, Praha
- [6] Drápalová H. (2005): Studium vlivu stresových faktorů na intracelulární pH kvasinek pomocí fluorescenčních sond. Disertační práce, Fyzikální ústav UK, Praha
- [7] Čadek R. (2004): Odpověď kvasinkové buňky a stres: úloha iontových gradientů při udržování integrity membrány. Disertační práce, Fyzikální ústav UK, Praha
- [8] Kočí R. (2003): Vliv stresových podmínek na metabolickou aktivitu kvasinek. Pojednání k disertační práci, VUT Fakulta chemická, Brno
- [9] Bendová O., Janderová B. (1985): Základy biologie kvasinek. Státní pedagogické nakladatelství, Praha
- [10] Manuál k mikroskopu Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara USA)
- [11] A. Mendez-Vilasa A., Corbacho I., Gonzalez-Martin M.L., M.J. Nuevo M.J. (2004): Direct surface probing of cell wall-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by atomic force microscopy. *Appl. Surf. Sci.* **238**, 51–63.
- [12] Ahimou F., Touhami A., and Yves F. Dufrene Y.F. (2003): Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy. *Yeast* **20**, 25–30.
- [13] Canetta E., Adya A.K., Walker G.M. (2006): Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 308-315.
- [14] Adya A.K., Canetta E., Adya A.K., Walker G.M. (2006): Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* **255** (2006) 308-315. *FEMS Yeast Res.* **6**, 120-128.
- [15] http://cs.wikipedia.org/wiki/Mikroskopie_atom%C3%A1rn%C3%ADch_sil
- [16] <http://www.htest.cz/index.php?produkt=374>
- [17] <http://atmilab.upol.cz/mss/mss25.html>
- [18] <http://atmilab.upol.cz/>
- [19] http://www.aldebaran.cz/bulletin/2004_27_pic.html
- [20] <http://www.cmi.cz/index.php?lang=1&wdc=37>
- [21] <http://www.otevrena-veda.cz/ov/data/konf/sbornik/030.pdf>
- [22] <http://www.lidovky.cz/vedci-dostanou-nove-bryle-09g>
- [23] [/ln_veda.asp?c=A070301_094402_ln_veda_vvr](http://www.lidovky.cz/vedci-dostanou-nove-bryle-09g/_ln_veda.asp?c=A070301_094402_ln_veda_vvr)
- [24] <http://www.osel.cz/index.php?clanek=2489>
- [25] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvasinky>

