rchive of SID

میکروسکوپ نیروی اتمی سیالی و کاربردهای آن در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

نویسندگان

فاطمه خاکراه[۱و۴*]
فاطمه ناصری[۲و۴]
زینب زعفرانی[۳و۴]

* pkhakrah@yahoo.com

چکیده

میکروسکوپ نیروی اتمی سیالی[۵] یک نوع میکروسکوپ پروبی روبشی است که به‌طور معمول با یک میکروسکوپ نوری معکوس استفاده می‌شود. ویژگی منحصر به فرد FluidFM، دارا بودن کانال‌های (مجراهای) میکروسکوپی در پروب میکروسکوپ نیروی اتمی[۶] است. این کانال‌ها می‌توانند منافذی کوچکتر از ۳۰۰ نانومتر داشته باشند. این ویژگی‌های نانومتری، بررسی حجم مایع در مقیاس فمتولیتر[۷] را امکان‌پذیر می‌سازد. جامع بودن و کارایی بالای FluidFM، آزمایش را در مقیاس کمتر از میکرون نه تنها در زیست‌شناسی بلکه در فیزیک، شیمی و علم مواد نیز شبیه‌سازی می‌کند.

واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ نیروی سیال، میکروسکوپ نیروی اتمی، سلول منفرد.

مقدمه

در حقیقت میکروسکوپ نیروی سیال، یک نوع میکروسکوپ نیروی اتمی است که براساس پروب‌های توخالی (میان تهی) برای توزیع، انتقال[۸] مایع و تحریک سلول‌های منفرد[۹] زنده در شرایط فیزیولوژیکی استفاده می‌شود. کانال نانوسیال در پروب، امکان انتقال و رهایش مولکول‌های محلول را از طریق منفذ (دهانه) با ابعادی کوچکتر از میکرون، در سوزن AFM فراهم می‌کند. مدار بازخورد نیرو در AFM، نزدیک شدن کنترل شده سوزن به سطح نمونه را برای اصلاح موضعی سطوح در محیط‌های مایع آسان می‌کند. همچنین تبادل قابل اعتمادی در تماس آهسته (ملایم) با غشاء سلولی و یا سوراخ کردن آن را فراهم می‌کند. با استفاده از این تزریق و تبادل، می‌توان برای تهیه تصویر و دستکاری سلول‌های منفرد، ساختارها و اجزاء سلول در محیط طبیعی خود استفاده کرد که برای تحقیقات در حوزه‌های مختلف نظیر کشف دارو و تشخیص بیماری اهمیت زیادی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

اصول و عملکرد میکروسکوپ نیروی اتمی سیالی

در دو دهه گذشته، به کمک میکروسکوپ نیروی اتمی تحول بزرگی در بررسی سطح نانومواد ایجاد شد. با این نوع میکروسکوپ، علاوه‌بر تهیه تصویر با توان تفکیک اتمی [۱]، امکان جابجایی اتم‌ها [۲]، دستکاری و تغییر شکل مولکول‌های پیچیده [۳] و انتقال (رهاسازی) مولکول‌ها به‌طور موضعی در سطح [۴] نیز وجود دارد که به مطالعات زیست‌شناسی سلولی کمک می‌کند. به کمک AFM، ویژگی‌های مورفولوژی غشاء [۵]، خواص مکانیکی [۶]، سازوکار تقسیم [۷]، متابولیسم [۸]، تغییر شکل ولتاژ القایی [۹] یا چسبندگی قابل بررسی است [۱۰و۱۱]؛ همچنین به‌عنوان ابزاری ارزشمند برای بررسی و تشخیص سلول‌های سالم، بیمار و تشخیص سرطان به‌کار می‌رود [۱۲]. بنابراین، استفاده از AFM برای دستکاری سلول‌ها تا حد زیادی به فرآیندهای مکانیکی مانند ایجاد خراش، فشرده‌سازی و کشش محدود می‌شود.

در این مقاله با بهره‌گیری از اصول AFM، کاربرد جدیدی معرفی می‌شود که شامل دستکاری سلول‌های زیستی زنده، از طریق انتقال مستقیم عوامل فعال از محلول است؛ FluidFM موقعیت دقیق نیروی کنترل شده AFM را با استفاده از سیال تلفیق می‌کند که در آن یک کانال میکرونی در پروب AFM تعبیه شده‌است و از طریق کانال‌هایی در نگهدارنده پایه AFM به یک سیستم انتقال متصل می‌شود؛ بنابراین، کانال پیوسته و بسته‌ای ایجاد می‌شود که می‌تواند با یک محلول دلخواه پر و در محیط مایع غوطه‌ور شود. FluidFM را می‌توان در هوا و یا به‌صورت غوطه‌ور در مایع استفاده کرد. مایع خارجی یا حمام و مایع میکروکانال ممکن است یکسان یا متفاوت باشند. در هنگام توزیع مایع، بستر را می‌توان به‌طور همزمان با میکروسکوپ نوری از طریق نگهدارنده پروب شفاف یا بستر شیشه‌ای مشاهده کرد (شکل (۱-الف)). منفذ در انتهای پروب AFM، امکان توزیع و انتشار مایعات را به‌طور موضعی فراهم می‌کند که با استفاده از آن می‌توان مواد را به درون سلول زنده تزریق نمود. در هنگام نزدیک شدن سوزن به نمونه و انتقال مایع، نیرو با استفاده از سوزن به نمونه اعمال می‌شود. این روش مشابه استفاده از تزریق میکرونی[۱۰] با استفاده از پیپت‌های شیشه‌ای است. اما تفاوت‌هایی بین آنها وجود دارد. در روش تزریق میکرونی، از میکروسکوپ نوری برای کنترل موقعیت سوزن پیپت شیشه‌ای در صفحه xy و در جهت z (از طریق تمرکز بر تصویر) استفاده می‌شود. به‌دلیل وضوح محدود میکروسکوپ نوری، ساختارها و اجزاء سلول نشان داده نمی‌شود و تماس سوزن با غشاء سلول را نمی‌توان از نفوذ سوزن در غشاء تشخیص داد و در واقع کنترل و نفوذ سوزن به داخل غشاء امکان‌پذیر نیست. سلول‌ها بیشتر در معرض آسیب هستند؛ بنابراین به مهارت‌های شخصی برای تزریق میکرونی نیاز است [۱۳].

توان تفکیک اتمی محدود این روش و نبود اطلاعات مکانیکی، مانع از تهیه تصویر با توان تفکیک بالا می‌شود. اما در روش تزریق میکرونی با FluidFM، کنترل مستقیم نیروهای اعمال شده با AFM امکان‌پذیر است. استفاده از مدار بازخورد نیرو با دقت بالا، آسیب احتمالی به سلول را کاهش می‌دهد؛ شکل هندسی پروب، نیروهای تماسی معمول روی سلول و لرزش‌های جانبی سوزن را به حداقل می‌رساند که این نیروها می‌توانند غشاء سلول را پاره کنند. کنترل نیرو در سیستم توزیع / تزریق امکان توزیع موضعی روی سطوح را فراهم می‌کند. با استفاده از بازخورد نیرو، سوزن می‌تواند بدون احتمال آسیب به نمونه یا به سوزن، بسیار نزدیک نمونه شود و حداقل مقدار محلول به‌طور مستقیم در محل موردنظر رها شود. توزیع موضعی، امکان تحریک دقیق سلول‌ها را فراهم می‌کند. پروب توخالی به یک پایه سیلیکونی متصل است. میکروکانال‌های بسته پروب وارد پایه سیلیکونی شده و به یک مخزن باز ختم می‌شود. سوزن از جنس سیلیکون نیترید (Si_3N_4) با ضخامت دیواره ۱۰۰ نانومتر ساخته شده‌است. منفذ با استفاده از پرتو یونی متمرکز[۱۱]، با قطری در حدود ۱ میکرومتر تا ۱۰۰ نانومتر ایجاد می‌شود. یک لایه فلزی (طلا و یا پلاتین) در هر دو طرف پروب به‌منظور جلوگیری از تاثیرات شارژ در حین سوراخ‌کاری پوشش داده می‌شود که باعث افزایش انعکاس نور لیزر می‌شود. باتوجه به انعطاف‌پذیری FIB، می‌توان موقعیت نسبی منفذ نزدیک به انتهای سوزن (به‌منظور تسهیل آزمایش‌های تزریق به سلول پس از سوراخ‌کردن غشاء آن)، یا در رأس سوزن (برای توزیع بر سطح یا تماس نرم با غشاء سلولی) انتخاب کرد که به ترتیب در شکل‌های (۱-ب) و (۱-ج) نشان داده شده‌است.

کاربردهای FluidFM:

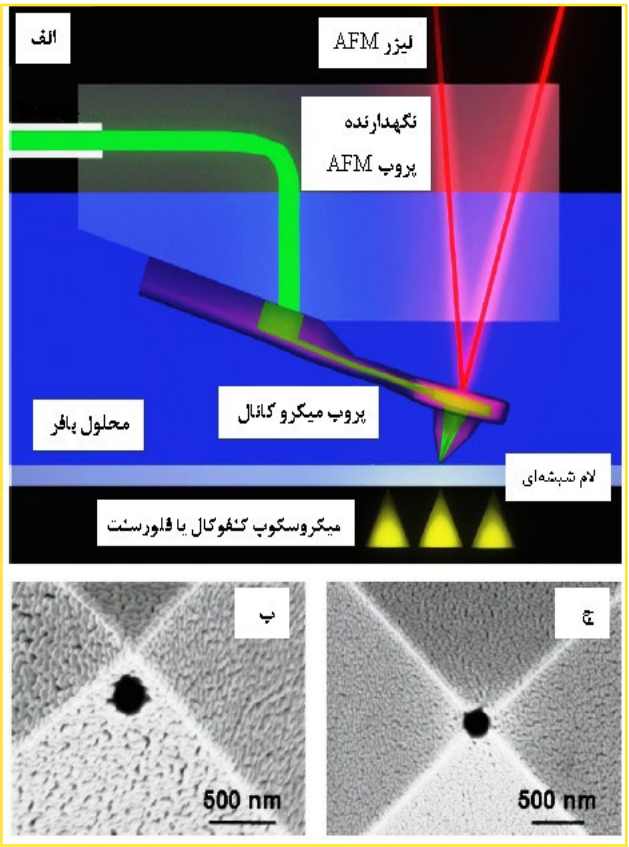
به برخی از مهمترین کاربردهای FluidFM می‌توان به شرح زیر اشاره نمود:

• تزریق مولکول‌های زیستی[۴]:

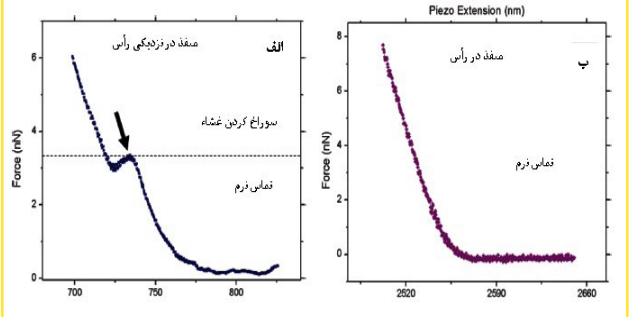
تزریق سلول منفرد، ابزاری مهم در زیست‌شناسی و پزشکی است. برای انجام آزمایش‌های تزریق سلول منفرد، با سوراخ کردن سلول به‌وسیله پروب، ماده تزریق می‌شود. با FluidFM، میزان موفقیت در مقایسه با دیگر روش‌ها تقریباً ۱۰۰ درصد است، زیرا پروب‌ها کوچک، تیز و قوی هستند. یک سلول منفرد می‌تواند از یک سلول چسبیده و حتی مخلوط کشت سلولی یا سوسپانسیون سلولی جدا شود. از FluidFM برای جداسازی سلول‌های پستان، مخمر و باکتری استفاده شده‌است [۱۴]. با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی سیالی، می‌توان پروب را به درون هسته سلول

www.SID.ir

rchive of SID



شکل (۱): FluidFM. (الف) پروب میکروکانال که به نگهدارنده پروب AFM وصل شده‌است. این سیستم تا فشار ۴ بار مقاوم است اما به‌طور معمول، از ۱۰ میلی‌بار استفاده می‌شود. (ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از منفذ نزدیک به انتهای سوزن هرمی شکل AFM برای انجام آزمایش‌های تزریق داخل سلولی. (ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از منفذ در انتهای سوزن هرمی شکل AFM برای آزمایش‌های رنگ‌آمیزی سلول با تماس ملایم [۱۴].



شکل (۲): روش‌های تماس با غشاء سلولی. (الف) منحنی فاصله - نیرو در یک سلول جوانه ماهیچه برای پروب با منفذی نزدیک به انتهای سوزن (k برابر است با ۰/۳ نیوتن بر متر، سرعت نزدیک شدن ۵۰ نانومتر بر ثانیه)؛ نقطه تنظیم حدود ۳ نانونیوتن، دو روش تماس را از هم جدا می‌کند، تماس نرم روی غشاء سلولی و ایجاد سوراخ به‌منظور تزریق داخل سلولی. (ب) منحنی فاصله - نیرو در سلول‌های جوانه ماهیچه برای پروب با منفذ ۱ میکرومتر در رأس هرم، (K برابر است با ۰/۳ نیوتن بر متر، سرعت نزدیک شدن ۵۰ نانومتر بر ثانیه)؛ در این حالت هیچ ناپیوستگی به‌نظر نمی‌رسد [۱۵].

www.SID.ir

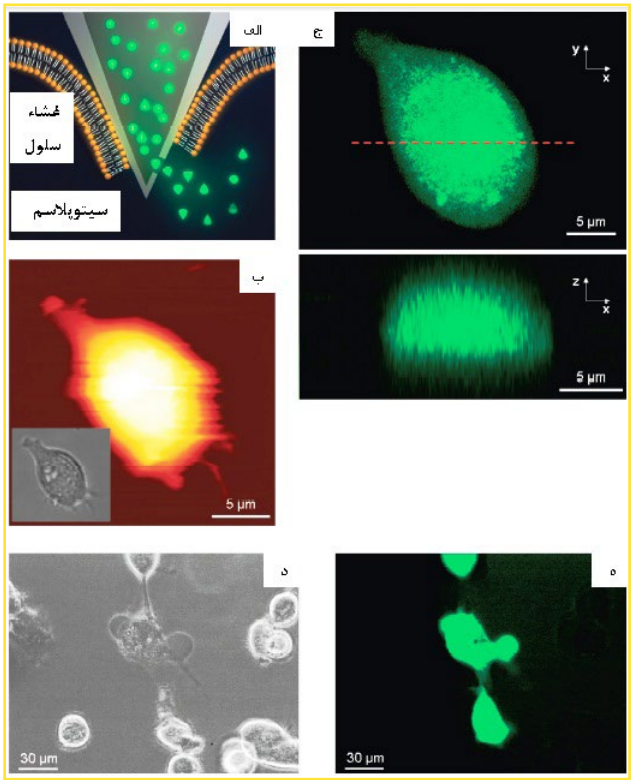
فرو برده و سیال و مواد زیستی مورد نظر را درون آن تزریق کرد. از مزیت‌های سیستم آن است که می‌توان نیروی وارد شده به سیتوپلاسم و هسته را رصد کرد، همچنین مقدار فشار اعمال شده برای رهایش سیال مورد نظر، قابل کنترل است. با تعیین مقدار فشار، می‌توان حجم ماده‌ای که قرار است تزریق شود را از یک یا دو پیکولیتر تا چند ده فمتولیتر کنترل کرد. همچنین از این روش برای تزریق‌های استاندارد شده به درون هسته سلول می‌توان استفاده نمود. از سوی دیگر، این میکروسکوپ می‌تواند امکان بررسی نقش یک پروتئین یا ژن را در سلول فراهم کند که این امر در مطالعه سلول‌های بنیادین، سرطان‌شناسی و عصب شناسی نقش مهمی دارد. سامانه تشخیص نیروی میکروسکوپ FluidFM به قدری حساس است که واکنش‌های بین نوک سوزن و نمونه را می‌توان به محدوده پیکونیوتن کاهش داد و بررسی نمونه‌های آسیب‌پذیر نظیر سلول‌های زنده را امکان‌پذیر می‌سازد. در یک سلول جوانه ماهیچه[۱۲] در نقطه تنظیم با نیروی کم، پروب با منفذ نزدیک به رأس سوزن (می‌تواند بدون اینکه غشاء سلولی را سوراخ نماید، به آهستگی نزدیک سلول‌ها شود. فلش، ناپیوستگی معمول در خراش دادن غشای سلولی را نشان می‌دهد (شکل (۲-الف)) [۱۵]. از سوی دیگر، همان‌طور که در منحنی فاصله - نیروی شکل (۲-الف) نشان داده شده‌است، عمل سوراخ‌کردن غشاء برای تزریق داخل سلولی به سادگی با انتخاب نیروی بالاتر، با استفاده از سوزن بسیار تیز (شعاع خمیدگی در حدود ده‌ها نانومتر) حاصل می‌شود. با توجه به شکل (۱-ج)، اگر منفذ در رأس قرار گیرد، هیچ جهشی در منحنی‌فاصله - نیرو مشاهده نمی‌شود (نمودار (۲-ب))، به این معنی که سوزن با «تماس نرم» با غشاء بدون پاره شدن آن باقی می‌ماند.

تزریق داخل سلولی با استفاده از نمک سدیم فلورسنایزوسیانات سدیم[۱۳] به‌عنوان رنگ در شکل (۳-الف) نشان داده می‌شود، زیرا نه به غشاء سلولی متصل است و نه به‌طور خودبه‌خود درآن پراکنده می‌شود. شکل (۳-ب) تصویر توپوگرافی میکروسکوپ نیروی اتمی از یک سلول جوانه ماهیچه است که در حالت مدولاسیون دامنه[۱۴] (AM) با کانال مایع همراه با محلول فیزیولوژی حاوی رنگ FITC گرفته شده‌است. حالت AM باعث کاهش نیروی اعمال شده بر سلول می‌شود و سلول با دقت سه‌بعدی تا جزئیات ۲۰۰ نانومتر را مشخص می‌کند که قابلیت پروب‌های میکروکانال را برای استفاده به‌عنوان پروب و نانوپیپت تأیید می‌کند. پس از تهیه تصویر با AFM، پروب متوقف شده و با کنترل‌کننده AFM، بالای نقطه موردنظر در سلول قرار می‌گیرد. با توجه به منحنی فاصله - نیرو، به‌منظور تعیین نقطه تنظیم برای نفوذ به غشاء سلولی، به حالت تماسی تغییر حالت داده، انتهای سوزن را به سلول نزدیک کرده، محلول فلورسنت به مدت چند ثانیه با فشار هیدرواستاتیک تزریق می‌شود و در نهایت سوزن از سلول دور می‌شود. با شبیه‌سازی نرخ جریان

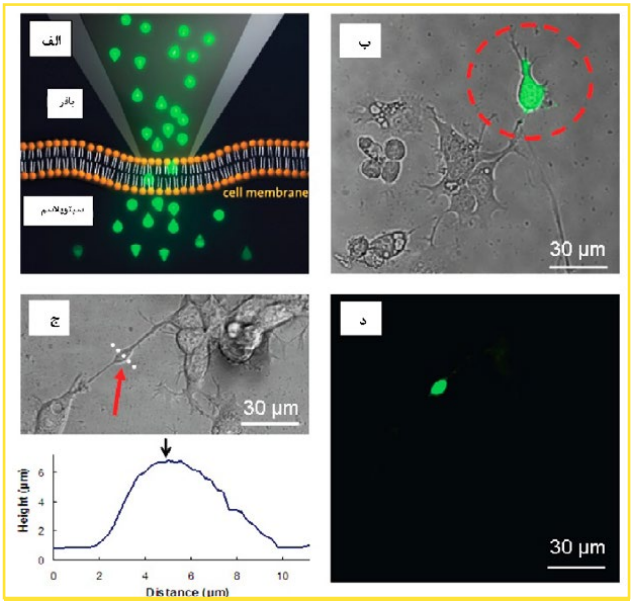
Archive of SID

از طریق منفذ پروب توخالی، می‌توان میزان تزریق محلول FITC را تخمین زد که کمتر از ۱۰ فمتولیتر است. شکل (۳-ج) تصویر فلورسنت با میکروسکوپ لیزری کنفوکال[۱۵] همان سلول است که در شکل (۳-ب) نشان داده شده‌است. مشاهده می‌شود که ورود مایع به سلول منجر به پیدایش سیگنال فلورسنت بدون تغییر مهمی در حجم سلول شده‌است. برای نشان دادن این که رنگ درون سلول است، تصاویر z (z-stack) گرفته شد. مقطع عرضی، شدت فلورسنت را نه تنها در غشای سلولی بلکه در سیتوزول نیز نشان می‌دهد. باقی ماندن رنگ در سلول نشان می‌دهد که غشاء پس از خروج سوزن، بهبود یافته و دوباره استحکام می‌یابد. شکل‌های (۳-د) و (۳-ه)، تزریق داخل سلولی FITC را به سه نورون نشان می‌دهد که یکی پس از دیگری با یک پروب میکروکانال انجام می‌شود و پروب‌ها را می‌توان به‌منظور دستکاری متوالی بدون گرفتگی استفاده کرد.

روش تماس آهسته با رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده نوروبلاستوما[۱۶] در شکل (۴-الف) نشان داده شده‌است. پروب



شکل (۳): (الف) روش تزریق داخل سلولی با سوراخ شدن غشاء را نشان می‌دهد (بدون مقیاس). منفذ به‌صورت عمدی در کنار رأس هرم به‌منظور تسهیل نفوذ در غشاء ایجاد می‌شود (حداقل نقطه تنظیم ۳ نانونیوتن). (ب) انطباق تصویر تداخل جوانه ماهیچه و تصویر مربوط به AFM (دامنه ۳۰ نانومتر، سرعت روبش ۰/۳ثانیه). (ج) تصویر CLSM از همان سلول برای Z=۱µm پس از ۱۵ ثانیه تزریق داخل سلولی FITC و مقطع عرضی در امتداد خط چین قرمز؛ ضخامت فلورسنت ۶ میکرومتر مطابق با ارتفاع سلول که با AFM اندازه‌گیری شده‌است. (د) و (ه) انطباق تصویر تداخل نروبلاستوما و تصویر فلورسنت به محض تزریق داخل سلولی FITC، از سه نورون در مرکز [۱۵].



شکل (۴): رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده نروبلاستوما با تماس آهسته روی غشاء سلولی. (الف) نمودار روش رنگ‌آمیزی با تماس آهسته (بدون مقیاس). (ب) انطباق تصویر تداخل اختلاف کنتراست و فلورسنت مربوط به یک سلول پس از رنگ‌آمیزی با ردیاب سلولی سبز. (ج) تصویر از تداخل تمایز یافته دو سلول نروبلاستوما که با یک برجستگی در قسمت میانی به هم متصل شده‌اند (فلش قرمز) و مقطع عرضی مربوطه در امتداد نقطه چین سفید رنگ. (حالت AM، دامنه ۵۰ نانومتر، سرعت روبش ۰/۱ ثانیه). (د) تصویر فلورسنت بعد از رنگ‌آمیزی با آکریدین نارنجی رنگ به مدت ۱ دقیقه [۱۶].

میکروکانال با رنگ فلورسنت غشاء به نام ردیاب سلولی سبز رنگ پرشده و با میکروسکوپ نوری روی سلول قرار می‌گیرد [۱۶]. سپس این پروب به سلول متصل شده و با یک تماس آهسته، رنگ مورد نظر به سیتوپلاسم سلول منتقل می‌شود. سوزن توخالی در تماس با غشاء سلولی به کمک بازخورد نیرو نگه داشته می‌شود (نقطه تنظیم کمتر از ۱ نانونیوتن). مواد در مجرای میکرونی به‌طور خودبه‌خودی از غشاء به سیتوپلاسم منتشر می‌شود. ردیاب سلولی سبز رنگ به‌دلیل ویژگی فلورسنت آن استفاده می‌شود که به فعالیت آنزیمی سلول زنده بستگی دارد.

رنگ سبز ردیاب سلولی، یک رنگ فلورسنت است که برای تهیه تصویر از حرکت و جابجایی سلول مناسب است. این رنگ از طریق غشاء سلول به داخل سلول منتقل و فعالیت آنزیمی سلول باعث انتشار رنگ فلورسنت می‌شود.

شکل (۴-ب) سلول‌های نوروبلاستوما را روی یک اسلاید شیشه‌ای در یک بافر فیزیولوژی نشان می‌دهد. پروب حاوی رنگ سبز ردیاب سلولی با سلول، تماس برقرار می‌کند که با یک دایره قرمز رنگ روی شکل نشان داده شده‌است؛ این تماس ۱۵ دقیقه طول می‌کشد که این زمان برای متابولیسم سلول و انتقال رنگ از میان غشاء و ظاهر شدن فلورسنت لازم است. سلول‌هایی که به‌وسیله سوزن در معرض این رنگ قرار می‌گیرند، فلورسنت می‌شوند در حالی که سلول‌های اطراف،

www.IJLK.ir
www.SID.ir

rchive of SID

این ویژگی را نشان نمی‌دهند که نشان‌دهنده نفوذ رنگ به سلول‌های موردنظر است. انتقال رنگ به ساختارهای داخل سلولی با تصویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ AFM مشاهده می‌شود. ابتدا یک ناحیه با میکروسکوپ FluidFM روبش شده و سپس اطلاعات توپوگرافی برای دستیابی به ساختارها و اجزاء سلول برای سیستم‌های میکروتزریق استفاده می‌شود.

شکل (۴-ج) تصویر دو سلول نوروبلاستوما را نشان می‌دهد که با یک برجستگی در قسمت میانی به هم متصل شده‌اند. پروب میکروسکوپ AFM حاوی رنگ فلورسنت آکریدین نارنجی به مدت یک دقیقه روی ناحیه برجسته شکل (۴-ج) قرار می‌گیرد و رنگ مورد نظر به آن ناحیه انتقال می‌یابد [۱۶]. تصویر فلورسنت مربوط به شکل (۴-د) یک برجستگی روشن با کاهش شدت رنگ فلورسنت در اطراف سلول نوریت دیده می‌شود که این موضوع نشان دهنده این است که یک محلول می‌تواند به سهولت به‌وسیله یک روش کنترل شده از طریق دستگاه AFM مایع به ساختارها و اجزاء سلولی منتقل شود.

انتقال مواد به داخل سلول براساس استفاده از میکروسکوپ AFM توسط دیگر محققان نیز ارائه شده‌است، در یافته‌های آنان سوزن‌های نانویی AFM با مولکول‌های انتخابی پوشش داده شده و سپس با اتصال از طریق غشاء سلول به داخل سلول منتقل می‌شوند.

با این حال، این طرح به ویژگی‌هایی از ساختار مولکول‌ها برمی‌گردد که می‌توانند به‌طور برگشت‌پذیر به سوزن AFM متصل شده و بعد به روش خودبخودی از نوک سوزن به محیط داخل سلول آزاد شوند. از آنجا که مولکول‌های زیستی که به داخل سلول منتقل می‌شوند به آن بلندی نیستند که به نوک سوزن پیوند خورده و یا جذب شوند، به راحتی در محلول انتقالی حل شده که این موضوع یک محدوده وسیع کار برای انتقال مواد به داخل سلول ایجاد می‌کند.

این محدوده از انتقال، امروزه از انتقال ذرات تا مطالعه چگونگی حرکت آنها در داخل سلول براساس عملکرد شیمیایی آنها، همانند انتقال پروتئین‌ها، ژن‌ها (به داخل هسته سلول)، آنزیم‌ها، لیگاندها برای مطالعات بنیادین در زیست‌شناسی سلولی و همچنین مطالعات مهندسی بافت استفاده می‌شود.

به‌علاوه، انتقال آهسته نانوذرات به داخل غشاء سلول، راه را برای مطالعاتی از قبیل رفتار ویروس‌ها در غشاء سلول و یا اثر داروها بر پروتئین‌های غشاء فراهم می‌کند.

دستکاری سلول‌های زنده

دستکاری سلول‌های زنده با استفاده از FluidFM می‌تواند با دقت میکرونی انجام شود. مواد می‌توانند به‌طور معکوس در منفذ پروب با استفاده از فشار منفی جابه‌جا شوند. سپس مواد را می‌توان روی بستر مورد نظر قرار داد و با استفاده از فشار مثبت رها کرد [۱۷]. با استفاده از این اصل، سلول‌های پستانداران (نورون‌ها)، مخمرها و باکتری‌ها دستکاری شدند. مشابه آزمایش‌های تزریق، دستکاری‌های متوالی با استفاده از پروب امکان‌پذیر است [۱۸].

نیروی چسبندگی سلولی

چسبندگی سلولی فرآیند فیزیولوژیکی شامل تعاملات بسیار منظم سلول‌ها با یکدیگر و یا با بسترشان است؛ با اندازه‌گیری چسبندگی سلول‌های منفرد، می‌توان اطلاعات مهمی برای موضوعات مختلف در زیست‌شناسی و علم مواد به‌دست آورد. نیروی چسبندگی را می‌توان با توان تفکیکی در مقیاس پیکومتر اندازه‌گیری کرد.

روش انجام آزمایش چسبندگی باکتری، همانند سلول منفرد است. این روش اطلاعاتی در مورد چگونگی ارتباط سلول‌های باکتری با یکدیگر و یا با بستر، ارائه می‌کند. FluidFM چندین قابلیت را برای مطالعه چسبندگی در سطح تک مولکول ارائه می‌دهد. همچنین با استفاده از طیف‌سنجی نیروی سلول منفرد[۱۷] براساس FluidFM، چسبندگی مخمرها و پستانداران مطالعه شده‌است [۱۹].

الکتروفیزیولوژی سلولی

الکتروفیزیولوژی سلولی، مطالعه خواص سلول‌ها و بافت‌های زیستی است. الکتروفیزیولوژی شامل اندازه‌گیری تغییر ولتاژ یا جریان الکتریکی در مقیاس‌های گسترده‌ای از پروتئین‌های دارای یک مجرای یونی تا تمام یک عضو مانند قلب است. کانال‌ها یا مجراهای یونی مسئول انتقال یون‌ها از طریق غشاء سلول هستند. اختلال در عملکرد این پروتئین‌ها همراه با وقوع چندین اختلال انسانی مانند آریتمی قلبی و بیماری‌های نوروژنیک است [۲۰ تا ۲۲]. در این زمینه، فناوری پچ کلمپ[۱۸] برای مطالعه فیزیک زیستی و فارماکولوژی خواص کانال‌های یونی در نظر گرفته شده‌است که برای دسترسی به داخل سلول، با اعمال ولتاژ در یک قسمت از غشاء سلول و با قرار دادن یک میکروپیپت شیشه‌ای روی سلول، فشار منفی کمی برای به‌دست آوردن مقاومت الکتریکی بالا (گیگاسل) استفاده می‌شود. در ابتدا، پیپت شیشه‌ای به کمک مکش ضعیفی به‌طور کامل به سلول می‌چسبد. سپس، مکش بیشتر در پیپت، غشاء را پاره می‌کند

www.SID.ir

Archive of SID

و دسترسی به سیتوپلاسم امکان‌پذیر می‌شود [۲۳]. به تازگی روش پچ کلمپ را با AFM از طریق فناوری FluidFM تلفیق کرده‌اند[۱۹] (Fluid-PC). این تلفیق، امکان مطالعه کانال‌های یونی و به‌طور هم‌زمان نیروی اعمال شده به سلول را ممکن می‌سازد [۱۷].

استخراج و تجزیه و تحلیل سلول منفرد

تجزیه و تحلیل سلول منفرد نشان داده است که ناهمگنی سلولی در فرآیندهای فیزیولوژیکی دخالت دارند [۲۴]. برای مطالعات متابولیک سلول منفرد، چند روش براساس یونیزاسیون سلول‌های منفرد توسعه یافته‌اند که باعث استخراج محتوای داخل سلولی آنها می‌شود. محققان بیش از ۳۰۰۰ سلول را تجزیه و تحلیل کرده‌اند که نشان‌دهنده توانایی این دستگاه برای تحقیق ناهمگنی متابولیکی در سطح سلول منفرد است. به‌عنوان مثال، ناهمگنی سلول منفرد جزایر لانگرهانس را بررسی کرده‌اند. با این حال، چنین روش‌هایی به‌طور معمول نیاز به استخراج سلول‌ها از محیط فیزیولوژیکی آنها دارد. در نتیجه، جداسازی سلول‌ها ممکن است بر عملکرد فیزیولوژیکی آنها تاثیر بگذارد. برای غلبه بر این محدودیت، فناوری FluidFM امکانات جدیدی را در زمینه تحلیل سلول منفرد ارائه می‌دهد که از این فناوری برای تجزیه و تحلیل مولکول‌های منفرد استخراج شده از بخش‌های مختلف سلول استفاده می‌کنند [۱۷].

در این راستا، پروب‌های FluidFM به‌صورت نوری روی سلول هدف قرار داده می‌شوند. سپس، طیف‌سنجی نیرو برای دسترسی به محفظه سلولی مورد نظر آغاز می‌شود. پروب یکدفعه وارد می‌شود، فشار منفی از طریق پروب میکروکانال برای استخراج محتوای سلولی اعمال می‌شود. پس از استخراج، عصاره‌ها با استفاده از روش‌های مختلف مانند میکروسکوپ الکترونی، تجزیه و تحلیل زیست شیمیایی می‌توانند مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرند [۲۵].

از دیگر کاربردهای FluidFM می‌توان به آزمایش‌های بررسی ذرات کلوئیدی، امکان اندازه‌گیری نیروهای تعامل بین ذرات کلوئیدی و سطوح اشاره نمود. گستره انجام این آزمایش‌ها نسبتاً کم است زیرا به‌طور معمول باید کلوئیدها را روی یک پروب AFM چسباند. پروب‌های کلوئیدی را می‌توان تحت فشار، به‌صورت برگشت‌پذیر به پروب FluidFM متصل کرد. بنابراین، یک پروب را می‌توان برای بسیاری از آزمایش‌ها و بسیاری از کلوئیدها استفاده کرد.

همچنین از FluidFM می‌توان در نانولیتوگرافی که فرآیند حکاکی، نوشتن یا چاپ ساختارها در محدوده نانومتر است، نیز استفاده کرد. در این روش می‌توان مقدار کمی از مایعات را از طریق سوزن یک پروب جدا کرد. با FluidFM می‌توان حجمی کمتر از fL تا مقادیر بیشتر از pL [۲۰] را توزیع نمود. FluidFM در محیط‌های هوا و مایع عمل می‌کند [۱۴].

نتیجه‌گیری

از زمان اختراع AFM و FluidFM به بسیاری از مسائل مهم زیستی در زمینه‌های مختلف پژوهش (به‌عنوان مثال، زیست‌شناسی ساختاری، میکروبیولوژی، زیست‌شناسی مولکولی و زیست فیزیک) پاسخ داده شده‌است. در حال حاضر، از FluidFM برای بررسی ساختار سلول‌ها، دستکاری و تزریق سلول‌های منفرد با رنگ‌ها و مولکول‌های زیستی، استخراج و تجزیه و تحلیل متابولیت‌ها از بخش‌های سلولی خاص و همچنین ثبت فعالیت‌های الکتریکی و انقباضی سلول‌ها استفاده می‌شود.

در این مقاله، تلفیق میکروسکوپ نیروی اتمی و نانو سیالات با انتقال سیال به کمک پروب‌های دستگاه AFM حاوی منافذ کنترل شده برای کاربردهای متعددی نظیر بررسی سلول منفرد معرفی شد. پروب‌های حاوی میکروکانال به‌طور موفقیت‌آمیزی از طریق یک نگهدارنده پروب AFM به دستگاه متصل می‌شوند، بنابراین، با کنترل نیرو، مولکول‌های انتخابی به داخل سلول‌های منفرد در داخل یک محیط فیزیولوژی منتقل می‌شوند. جامع بودن و کارآیی بالای FluidFM راهی برای انجام آزمایش‌ها در طیف گسترده‌ای از رشته‌ها، در فیزیک (فعل و انفعالات قطره‌ای)، علم مواد (حکاکی ابعادی کوچکتر از میکرون)، شیمی (عملکرد موضعی پلیمر) و الکترونیک مولکولی (قرارگیری پلیمر رسانا روی نانو الکترودها) و غیره باز می‌کند.

www.SID.ir

rchive of SID

پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد زمین‌شناسی اقتصادی، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد
۲. کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳. کارشناسی صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد
۴. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ پروبی روبشی

5. Fluid Force Microscope (FluidFM)
6. Atomic force microscopy (AFM)
7. Femtoliter (fL)
8. Delivery
9. Single Cell
10. Microjunction
11. Focused ion beam (FIB(
12. Myoblast
13. Fluorescein isocyanate sodium salt
14. Amplitudemodulation
15. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)
16. Neuroblastoma
17. Single cell force spectroscopy (SCFS)
18. Patch Clamp
19. Fluid- Patch Clamp (Fluid-PC)
20. picoliter (PL)

مراجع

[1] Barth, C.; Reichling, M. Nature 2001, 414, 54–57.

[2] Sugimoto, Y.; Abe, M.; Hirayama, S.; Oyabu, N.; Custance, O.; Morita,S. Nat. Mater. 2005, 4, 156–159.

[3] Thalhammer, S.; Stark, R. W.; Muller, S.; Wienberg, J.; Heckl, W. M.J. Struct. Biol. 1997, 119, 232–237.

[4] Piner, R. D.; Zhu, J.; Xu, F.; Hong, S. H.; Mirkin, C. A. Science 1999,283, 661–663.

[5] Henderson, E.; Haydon, P. G.; Sakaguchi, D. S. Science 1992, 257, 1944–1946.

[6] Simon, A.; Cohen-Bouhacina, T.; Aime, J. P.; Porte, M. C.; Amedee,J.; Baquey, C. Cell. Mol. Biol. 2004, 50, 255–266.

[7] Matzke, R.; Jacobson, K.; Radmacher, M. Nat. Cell Biol. 2001, 3,607–610.

[8] Pelling, A. E.; Sehati, S.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S.; Gimzewski,J. K. Science 2004, 305, 1147–1150.

[9] Zhang, P. C.; Keleshian, A. M.; Sachs, F. Nature 2001, 413, 428–432.

www.SID.ir

Archive of SID

[10] Benoit, M.; Gabriel, D.; Gerisch, G.; Gaub, H. E. Nat. Cell Biol. 2000,2, 313–317.

[11] Helenius, J.; Heisenberg, C. P.; Gaub, H. E.; Muller, D. J. J. Cell Sci.2008, 121, 1785–1791.

[12] Cross, S. E.; Jin, Y. S.; Rao, J.; Gimzewski, J. K. Nat. Nanotechnol.2007, 2, 780–783.

[13] Meister, A.; Gabi, M; Behr, P.; Studer,ph,;Voros, J,;Niedermann,Ph,;Bitterli, J,;Polesel-Maris, J,;Liley, M,; Heinzelmann,H,; Zambelli, T. Nano Letters. 2009, 6, 2501-2507.

[14] WWW.wikipedia.org

[15] Hategan, A.; Law, R.; Kahn, S.; Discher, D. E. Biophys. J. 2003, 85, 2746–2759.

[16] The membrane-permeable CellTracker and acridin orange were usedin combination with ethidium bromide to differentiate between livingand apoptotic cells.

[17] Amarouch,M; El Hilaly,J; Mazouzi,D. Hindawi.2018,10 pages.

[18] P.Dorig, P.Stiefel, P. Behr et al; Applied physics letters, 2010, vol 97,no 2.

[19] E.Potthoff, O. Guillaume-Gentil, D. Ossola et al; Plos One, 2012, vol 7, no 12.

[20] H. Abriel, n. Syam, V. Sottas, M. Y. Amarouch and J.S. Rougier; Biochemical Pharmacology, 2012, pp. 873-881.

[21] H. Abriel,E.V. Zaklyazminskaya, Gene;pp.1-11,2013.

[22] M. Y. Amarouch and H. Abriel, Frontiers in Physiology, vol.6, 2015.

[23] D. Ossola, M. Y. Amarouch, P. Behr, J. Voros, H. Abriel, and T.zambelli; Nano Letters, Vol. 15, no 3, pp. 1743-1750,2015.

[24] M.E.Lidstrom and m.C.Konopka, Nature Chemical Biology, Vol.6, no.10, pp 705-712, 2010.

[25] O. Guillaume-Gentil, T. Rey, P. Kiefer et al; Analytical Chemistry,vol 89, no. 9, pp. 5017-5023. 2017.

www.SID.ir