

Veeco Bioscope Catalyst

La soluzione ideale per estendere la Microscopia alla nanoscala in campo Biologico.



Il Bioscope Catalyst è il nuovo AFM sviluppato da Veeco per la ricerca in campo biologico. Fin dall'introduzione da parte di Veeco stessa nel 1994 del primo AFM installato su un Microscopio Ottico rovesciato la comunità scientifica ha colto i vantaggi della combinazione delle tecniche di Microscopia Ottica e delle tecniche della Microscopia a Scansione di Sonda. Infatti le immagini 3D ad alta risoluzione acquisite dall'AFM permettono di scavalcare il limite imposto alla microscopia ottica dalla diffrazione e di ampliare il campo di analisi offerto dalle marcature fluorescenti. Inoltre, mentre il microscopio ottico è un attore passivo nell'osservazione dei campioni, l'AFM può interagire con essi fornendo informazioni quantitative su proprietà nano meccaniche come forze di legame ed elasticità di superfici. Tutto questo sia in aria che in ambiente liquido e quindi in condizioni di biocompatibilità.

Gli oltre quindici anni di esperienza nello sviluppo dell'AFM su una piattaforma di un Microscopio Ottico rovesciato hanno portato Veeco alla conclusione che le due tecnologie non siano semplicemente complementari ma anzi sinergiche ossia che la loro combinazione ed integrazione offra capacità di indagine superiori alla somma delle capacità offerte dalle due tecnologie separatamente. Da qui l'idea che la nuova piattaforma realizzata possa agire da catalizzatore (Catalyst) per la ricerca scientifica abbassando le barriere e accelerando il succedersi di nuove scoperte.

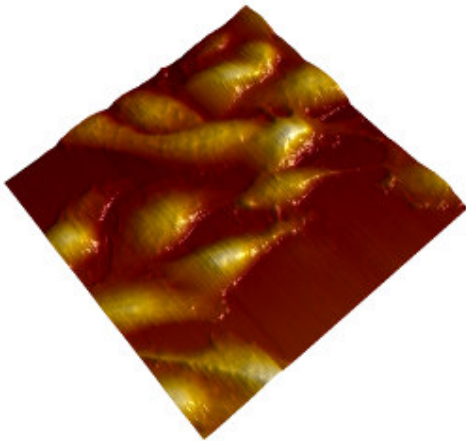
Lo sviluppo progettuale del nuovo Bioscope Catalyst è stato guidato dai seguenti obiettivi di qualità:

- prestazioni AFM senza compromessi sia a grande scala che ad altissima risoluzione
- massima integrazione con le parti e le tecniche avanzate di Microscopia Ottica
- facilità di utilizzo e massima produttività
- massima compatibilità e soluzioni efficaci ad hoc per campioni biologici

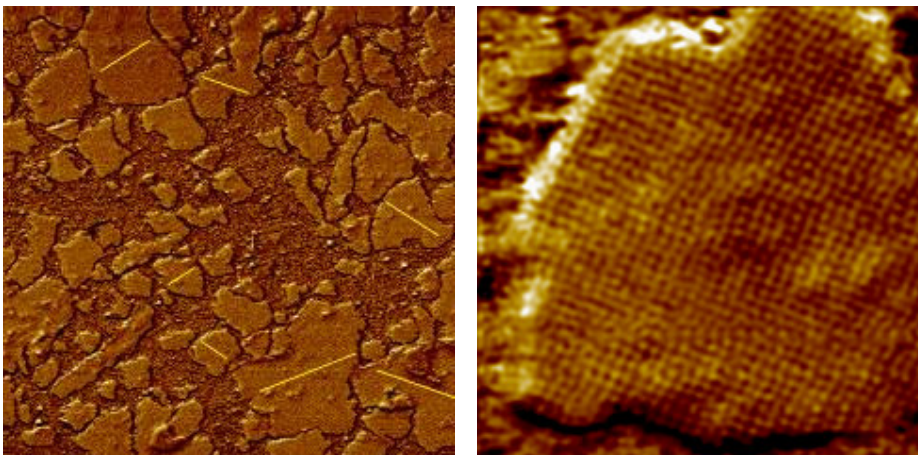
Nel seguito tratteremo queste tematiche offrendo anche qualche breve esempio applicativo.

Prestazioni AFM al top della gamma

Le eccezionali prestazioni dell'unità di scansione permettono di ottenere immagini su campi estremamente grandi, fino a $150\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$ in closed loop, senza compromettere la qualità delle misure alla nanoscala. L'innovativo attuatore piezoelettrico in Z consente anch'esso un ampio range verticale necessario per l'imaging di cellule, mantenendo una risoluzione verticale subnanometrica ed un eccezionale controllo della forza di interazione. A dimostrazione portiamo due semplici esempi, nel primo è riportata un'immagine relativa ad una popolazione di cellule HeLa, il range di scansione laterale è di $150\mu\text{m}$ e la misura è stata ottenuta in Contact Mode in ambiente liquido.

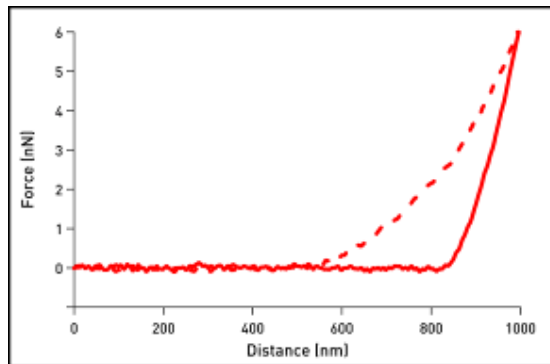
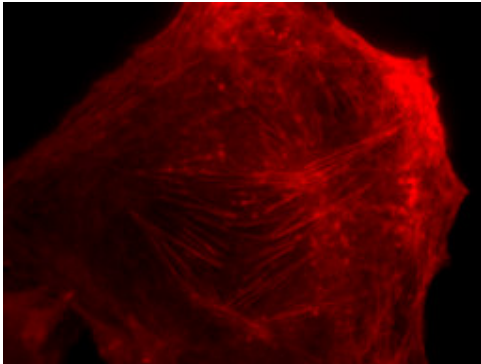


Nel secondo esempio viene analizzato lo Strato S (S-layer) di una membrana batterica su mica. La tecnica di scansione utilizzata è il Tapping Mode in soluzione. L'immagine a sinistra è ampia $5\mu\text{m}$ e si intravede il lattice periodico formato dalle proteine, si nota inoltre che le varie placche hanno un'orientazione del lattice casuale come indicato dalle linee chiare. Effettuando uno zoom su un'area di 500nm di lato è ben visibile il lattice di proteine ed è misurabile il periodo di 14nm confermando la capacità del sistema di arrivare a risoluzione molecolare in soluzione.

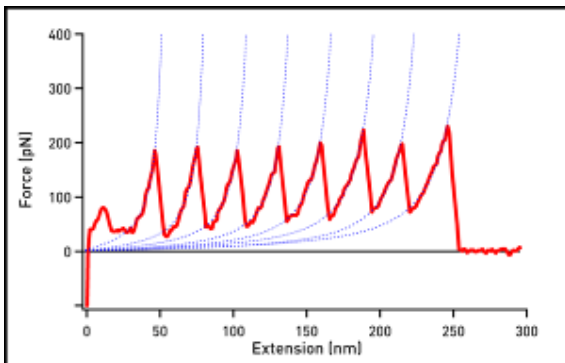


Recentemente la Spettroscopia di Forza si è dimostrata di fondamentale interesse per i gruppi che utilizzano AFM in campo biologico; pertanto è stata prestata particolare attenzione nel realizzare uno scanner che offrisse prestazioni allo stato dell'arte in questo campo. In primis è stato progettato un cammino del laser verticale sul cantilever così da ottenere la migliore accuratezza possibile nelle misure di deflessioni verticali. Quindi è stato sviluppato un Sensore in Z del tutto nuovo a bassissimo rumore così da permettere rampe in Z a partire da poche decine di nm fino a diversi μm sia in closed loop che in open loop. Infine il sistema è stato dotato di una routine (Thermal Tune) che consente di misurare la costante elastica del cantilever.

Sulla sinistra è riportata l'immagine ottica di una cellula di osteosarcoma fluorescente. È possibile riconoscere la struttura di actina del citoscheletro che costituisce la struttura portante della cellula. L'AFM è stato usato in questo caso per fare curve di forza sulla cellula prima e dopo il trattamento chimico volto a danneggiare la struttura di actina. All'inizio è stato soltanto notato che la fluorescenza dell'actina svanisce (l'immagine ottica diventa totalmente scura) poi le curve di forza mostrano una marcata diminuzione della rigidità della cellula la cui superficie diventa estremamente soft. Nel grafico a fianco la linea continua si riferisce alla cellula non trattata mentre la linea tratteggiata alla cellula trattata: dal grafico si evince che all'aumentare della forza la superficie della cellula trattata cede assorbendo parte della deflessione della leva.



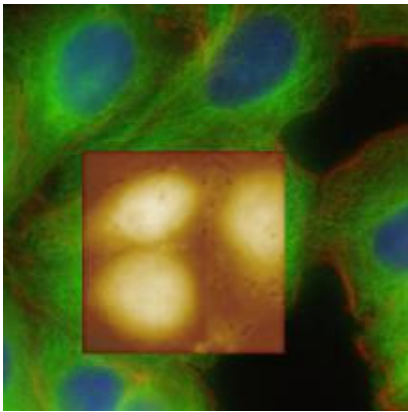
Grazie al percorso del laser perpendicolare al cantilever il rumore di fondo in spettroscopia di forza è limitato essenzialmente dal rumore termico (dell'ordine di 10pN) consentendo misure di forza estremamente piccole come dimostrato dal seguente classico esempio di unfolding della titina; in questo caso la forza che lega i singoli domini di questa proteina si attesta intorno ai 200pN.



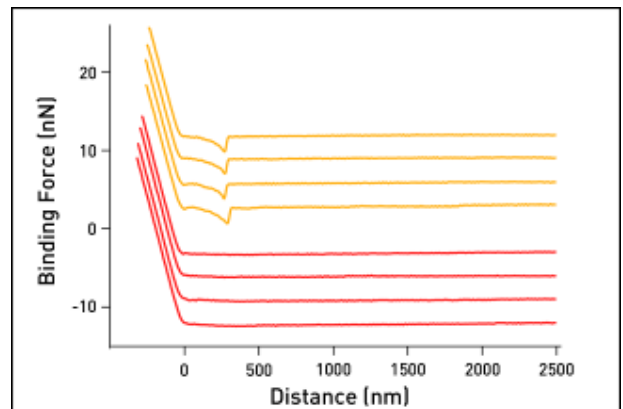
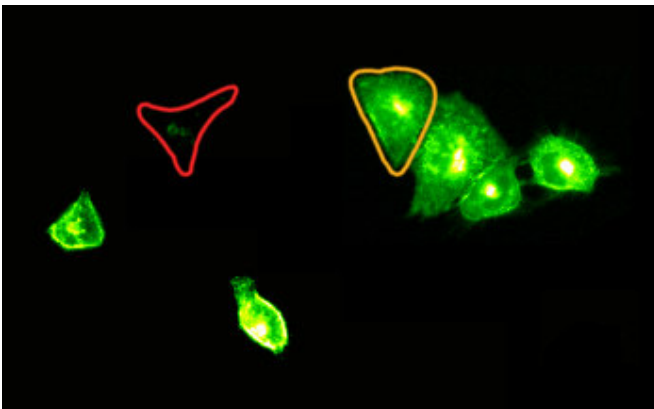
Integrazione con il Microscopio Ottico Rovesciato

Le eccezionali prestazioni dell'AFM non devono tuttavia compromettere la qualità delle analisi ottiche. A questo proposito il Bioscope Catalyst è tutt'oggi l'unico sistema compatibile con condensatori con apertura numerica di 0.5 importanti per ottenere buoni risultati in luce trasmessa. Le tecniche di fluorescenza, incluso l'imaging confocale, sono garantite grazie all'utilizzo per l'AFM di un laser nel vicino IR che non interferisce con i comuni fluorofori rossi come ad esempio Texas Red. Inoltre il notevole spazio al di sotto dello stage permettono una torretta completamente popolata di obiettivi anche ad immersione per alta risoluzione. Ma l'integrazione fisica è solo l'anticamera dell'integrazione funzionale che rende sinergiche le due tecnologie (MO e AFM). L'integrazione funzionale è ottenuta mediante il software MIRO che permette di acquisire immagini ottiche e AFM come se avessero un unico sistema di riferimento permettendo così di navigare l'immagine ottica con l'AFM e sovrapporre e fondere in una unica schermata in maniera semplice ed efficace segnali che recano diverse informazioni.

A dimostrazione di tutto ciò viene riportato una immagine ottenuta utilizzando il Catalyst su un Leica TCS SP5 munito di un obiettivo ad immersione 63X. Le cellule in questione sono HeLa marcate con tre diversi fluorofori, all'immagine ottica è stata sovrapposta l'immagine AFM ottenuta scegliendo l'area di scansione direttamente sull'immagine ottica.



Ma grazie a MIRO possiamo pensare il sistema come dotato di occhi per vedere i siti di interesse (Microscopio Ottico) e dita per tastare il campione (AFM) permettendo di fondere insieme le due sensazioni in un unico quadro informativo. Nell'esempio mostrato sotto le cellule sono state modificate al fine di avere l'espressione di una proteina fluorescente sul lato esterno della loro membrana. Nell'immagine è stata evidenziata in giallo una cellula che ha espresso queste proteine mentre in rosso una cellula che ha espresso in misura minore le proteine in questione e risulta più scura. Effettuando delle curve di forza mediante una punta funzionalizzata in maniera da legarsi specificamente con la proteina in esame si trova una forte correlazione tra fluorescenza e forza di legame, esaminando le curve di forza statisticamente si nota che sulle cellule più luminose vi sono diversi eventi di legame (picchi verticali nella curva di forza gialle) mentre nelle cellule più scure questi picchi sono assenti (curve di forza rosse).

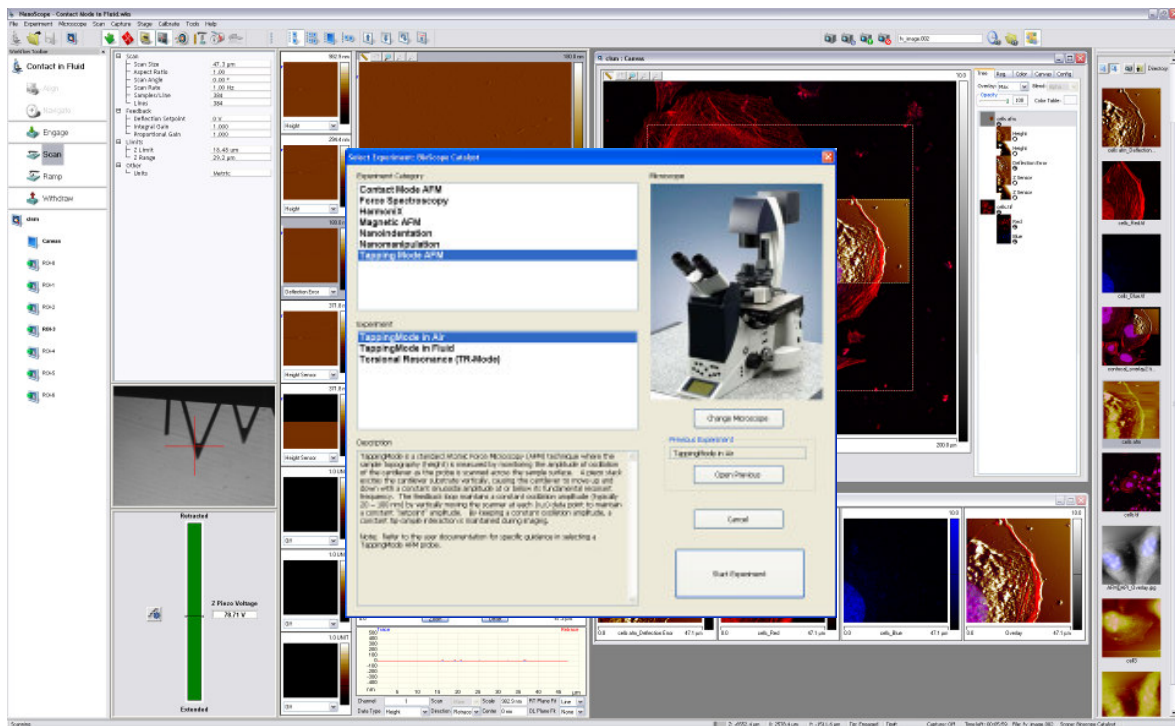


Facilità d'uso

In ambito biologico, gran parte degli utilizzatori di AFM non ambisce ad essere un esperto della tecnologia AFM quanto di riuscire ad usarla al meglio sui propri campioni. In altre parole l'interesse non è tanto sui dettagli della strumentazione quanto sull'esperimento. Per questo Veeco ha posto particolare attenzione nel rendere il Bioscope Catalyst semplice e produttivo. Dal punto di vista dell'hardware due sono le innovazioni importanti: la prima riguarda una piattaforma per il montaggio delle sonde nel relativo holder (a sinistra, in nero per esperimenti in aria in bianco per esperimenti in liquido) così da rendere questo processo manuale semplice e rapido, la seconda è una stazione di allineamento che consente di allineare il laser sulla leva ed il conseguente fascio riflesso sul fotodiodo sia in aria che in liquido in maniera banale.



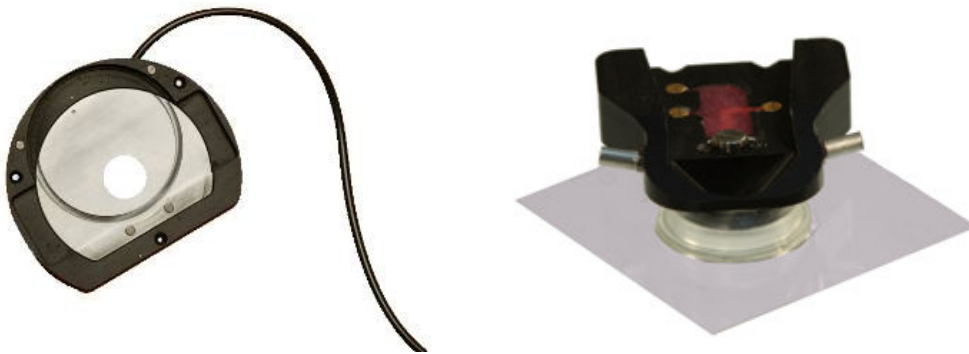
Dal punto di vista software, l'intera interfaccia è stata riprogettata al fine di organizzare i comandi e i pannelli di visualizzazione in maniera logica e razionale.



Al lancio dell'applicazione del software apparirà un selettore di esperimento che, oltre a dare una descrizione delle varie modalità di scansione disponibili, una volta effettuata la scelta provvederà a configurare adeguatamente parametri e pannelli. Il software è stato concepito con l'idea di "workflow" ossia ordinando comandi ed icone in relazione al loro effettivo utilizzo sequenziale. Con un semplice click è possibile ottimizzare la schermata a seconda dei segnali che si acquisiscono riorganizzando la pagina rispettivamente con 2 immagini, 4 immagini oppure 8 immagini con diverse disposizioni.

Accessori dedicati ad esperimenti biologici

Infine è noto che i campioni biologici a seconda del processo di preparazione sono disponibili su supporti dedicati ed in condizioni particolari. Il Bioscope Catalyst permette di montare in maniera banale vetrini, coprivetrini e piastre di petri di vari diametri e con fondo sia in vetro che in plastica. È possibile inoltre controllare la temperatura (sotto a sinistra) così da poter analizzare ad esempio cellule vive o anche per studiare doppi strati lipidici. Ovviamente queste analisi necessitano anche di operare in soluzione e magari con la possibilità di cambiare non solo la temperatura ma anche altre condizioni (introduzione di un farmaco, cambiamento del pH, introduzione di proteine...); tutto questo può essere fatto per mezzo di due celle a perfusione: la prima adattabile alle piastre di petri che permette di realizzare una sorta di mini incubatore adatto ad esempio a studi di lunga durata su cellule vive, la seconda (mostrata sotto a destra) basata su una cella a piccolo volume (circa 60 μ l) che permette di cambiare il liquido più rapidamente e consente una più rapida termalizzazione.



Il Bioscope Catalyst è quindi un sistema AFM capace di un ampissimo range di scansione, in grado di raggiungere risoluzione molecolare, dotato di una sensibilità nella misura di interazioni limitata solo dal rumore termico. L'accoppiamento funzionale con il Microscopio Ottico rovesciato consente di estrarre il meglio dalle due tecnologie in maniera semplice e rapida su tutti i tipici campioni di interesse biologico.

Marketing Office
marketing@2mstrumenti.com