

Studio mediante Microscopia a Forza Atomica (Atomic Force Microscopy – AFM) dell'interazione tra DNA e molecole organiche di sintesi

La possibilità di osservare direttamente singole molecole dà grandi vantaggi per comprendere come esse si comportano, svolgono le loro funzioni, interagiscono con altre molecole, rispondono a stimoli esterni. Ovviamente, date le loro piccole dimensioni, si parla di Ångstrom (10^{-10} metri), nanometri (10^{-9} metri), questo tipo di studio risulta possibile mediante tecniche e strumentazioni che vanno oltre i limiti della microscopia ottica. Tra queste troviamo la microscopia a forza atomica (AFM) che ci permette di osservare anche molecole organiche di dimensioni di pochi nanometri, anche in condizioni sperimentali piuttosto vicine a quelle in cui le molecole stesse si trovano ad operare naturalmente.

In questo esperimento osserveremo molecole di DNA depositate su superficie di mica mediante procedure e condizioni sperimentali opportune (figura 1A) e valuteremo come la loro forma venga eventualmente modificata dalla presenza di molecole organiche preparate appositamente per questo scopo. La mica, di cui è costituita la superficie su cui depositeremo i nostri campioni per l'analisi, è un allumino-silicato, di formula chimica $K^+ \{ [Al_2(OH)_2]^{4+} [AlSi_3O_{10}]^{5-} \}^-$ e di struttura lamellare (figura 1B,C).

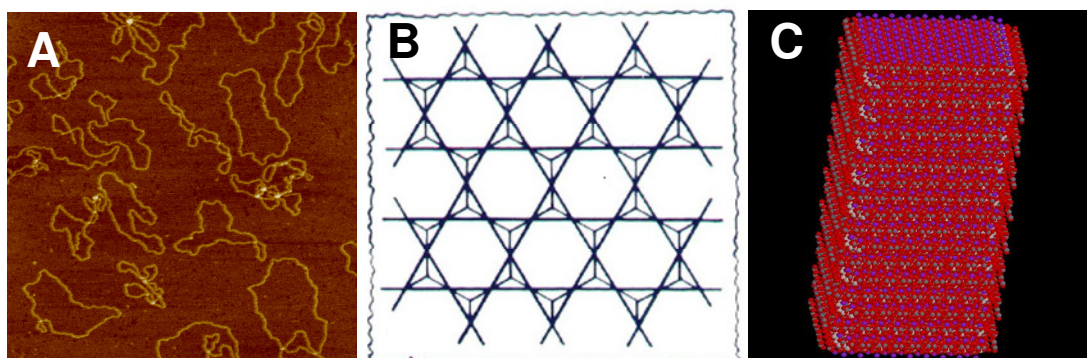


Figura 1: A) Immagine di DNA plasmidico registrata mediante AFM. La scansione eseguita è su una superficie di $2 \times 2 \mu\text{m}$, il che significa che, se ciascuna molecola di DNA fosse della dimensione in cui appare nell'immagine, noi saremmo alti 10^4 metri.

Struttura della mica, allumino-silicato appartenente alla classe dei fillosilicati. B) Immagine di una strato della struttura lamellare, multipla degli anioni $[Si_4O_{10}]^{4-}$, in cui ciascun tetraedro SiO_4 condivide tre dei quattro atomi di ossigeno con i tetraedri vicini. C) Immagine tridimensionale degli strati sovrapposti nel cristallo di mica. In figura gli atomi sono rappresentati nel seguente modo: rosso = ossigeno, viola = potassio, grigio = silicio, marrone = alluminio.

L'ambito in cui si colloca questa esperienza è quello dello studio degli effetti provocati su filamenti di DNA da parte di molecole progettate e preparate nei nostri laboratori come potenziali vettori genici capaci di trasportare acidi nucleici all'interno di cellule per scopi terapeutici. E' noto infatti che una fondamentale condizione preliminare affinché una molecola sia in grado di trasportare il DNA nella cellula superandone la membrana, è la sua capacità di neutralizzare le cariche negative dell'acido nucleico e di modificarne consistentemente il naturale ripiegamento.

COME FUNZIONA L'AFM

Il microscopio a forza atomica (figura 2A), altrimenti detto *a scansione di forza* (SFM), non utilizza lenti per formare l'immagine, ma tramite una sottilissima punta situata all'estremità di una leva flessibile (cantilever), esegue una scansione sulla superficie del campione. Durante la scansione si stabiliscono deboli forze di interazione tra punta e campione, che determinano una flessione della leva ed una conseguente rivelazione della topografia della superficie. E' possibile rilevare deflessioni della leva fino a 0.01 nm tramite un sistema ottico costituito da un laser e da un fotodiodo. Il laser viene riflesso dal retro del cantilever (figura 2B) verso il fotomoltiplicatore (figura 2C) che converte l'energia luminosa in energia elettrica e amplifica il segnale in entrata. Il fotodiodo è costituito da due quadranti tra i quali si misura la differenza di corrente in uscita. Tale differenza è proporzionale alla deflessione della leva. In condizioni di deflessione nulla, tale differenza è assunta come riferimento e posta uguale a zero. Grazie a questo sistema, i movimenti della leva vengono amplificati di svariate volte; per una leva di lunghezza l e un fotorivelatore posto a distanza $2L$, il "guadagno della leva ottica" è uguale a $2L/l$.

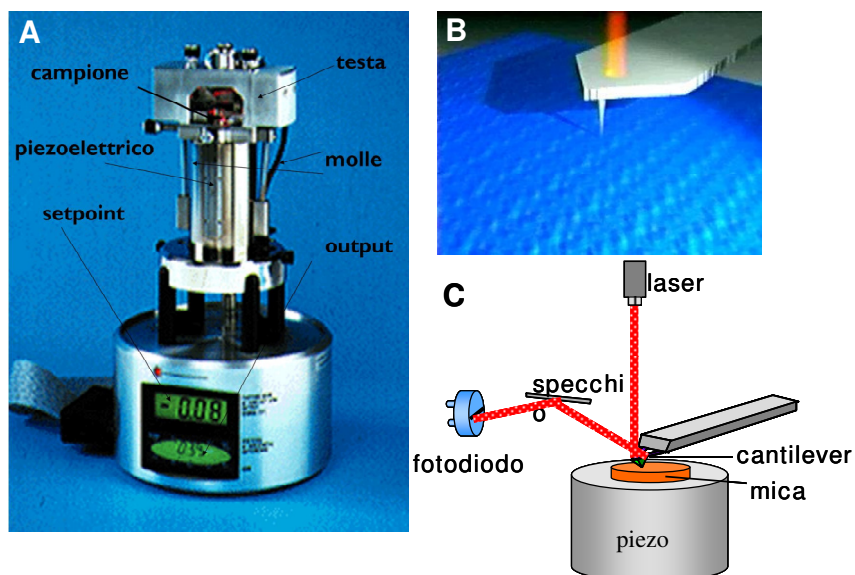


Figura 2: Microscopia a forza atomica (AFM). A) Immagine del microscopio a forza atomica; sulla figura sono indicati i componenti principali dello strumento. B) Immagine del laser riflesso dal retro del cantilever. C) Schema di funzionamento del microscopio a forza atomica: il campione è posizionato sul piezoelettrico, la punta ne scansiona la superficie e le conseguenti deflessioni della leva sono rilevate dal sistema ottico costituito da un laser, un insieme di lenti e un fotodiodo.

Il campione viene adagiato su un tubo piezoelettrico che ne permette lo spostamento lungo i tre assi (x , y , z). Il tubo piezoelettrico è costituito da un particolare materiale (ceramica piezoelettrica) che è in grado di espandersi o contrarsi in presenza di un campo elettrico. I moderni tubi piezoelettrici hanno la ceramica circondata ai lati da quattro elettrodi ed un quinto posizionato sulla faccia inferiore; in questo modo vengono realizzati gli spostamenti sul piano xy e lungo l'asse z . Applicando una differenza di potenziale tra gli elettrodi di alcuni millivolt è possibile spostare il campione di pochi Å. I movimenti lungo l'asse z servono per ristabilire lo stato di riferimento; infatti esiste un sistema di risposta a "feedback", tramite il quale il campione

viene spostato in alto o in basso di una quantità uguale e contraria alla deflessione della leva. Questo sistema è importante soprattutto nell'analisi di materiali biologici, perché consente di applicare una minima forza sul campione limitandone il danneggiamento.

MODALITA' OPERATIVE

Per quanto riguarda le applicazioni relative al campo biologico o comunque a molecole organiche, esistono due diversi modi operativi con cui può funzionare lo strumento: *contact mode* e *tapping mode*.

Nel "*contact mode*", la punta si trova in continuo contatto con la superficie del campione sulla quale si muove strisciando (figura 3A). Operando in questo modo, si ottengono immagini stabili ma la compressione e le forze di taglio che si generano tra la punta e la superficie possono danneggiare il campione. Le forze che operano tipicamente nel *contact mode* sono dell'ordine di 1-10 nN. Per questo motivo per indagini su campioni biologici è preferibile operare in "*tapping mode*" e questa sarà effettivamente la modalità in cui opereremo noi. In tale modalità la leva viene fatta oscillare ad una frequenza di alcune centinaia di kHz e stabilisce dunque un contatto transiente con la superficie del campione (figura 3B).

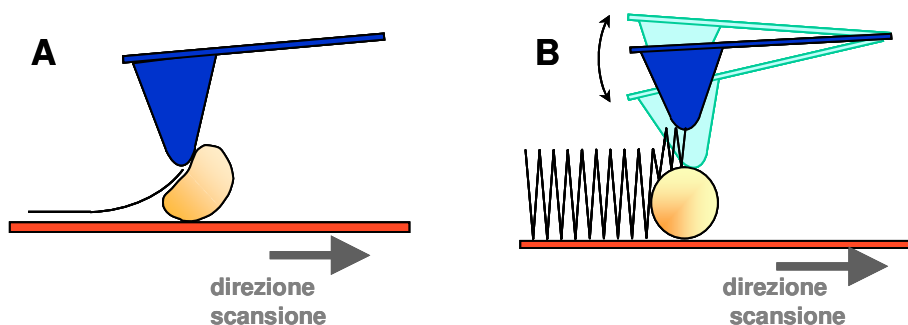


Figura 3: Modalità operative dell' AFM: A) Modalità "contact mode" in cui la punta è in costante contatto con la superficie del campione; B) Modalità "tapping mode" in cui il contatto tra punta e campione è transiente.

Dal momento che si stabilisce comunque un contatto diretto tra punta e campione, si ottengono immagini ad una risoluzione alta, paragonabile a quella raggiunta nel *contact mode*. Tuttavia, poiché il contatto è molto breve, il danneggiamento della superficie causato dalle forze di taglio durante la scansione si riduce notevolmente. Ottenere immagini di DNA risulta dunque più facile e realizzabile utilizzando il "*tapping mode*".

RISOLUZIONE SPAZIALE

Formulare una definizione generale di risoluzione spaziale nella microscopia a forza atomica non è semplice. Infatti, a differenza di quanto avviene per la microscopia ottica ed elettronica, la risoluzione non è una proprietà inerente soltanto allo strumento e dipendente dal suo design e dal modo operativo. Nell'AFM, la risoluzione è una proprietà che dipende sia da caratteristiche strumentali sia da parametri legati al campione.

Il più importante parametro strumentale è rappresentato dalle dimensioni della punta, e in particolare dal raggio di curvatura dell'estremità, R_c . Sono disponibili in commercio punte con un $R_c = 10$ nm che assicurano la risoluzione di oggetti posti ad una reciproca distanza di 5-10 nm. Utilizzando punte aventi una dimensione finita, le immagini di oggetti molto piccoli, quali le molecole di DNA o delle proteine, risultano distorte dal momento che la punta, avendo forma ellittica, non è in grado di seguire il reale profilo del campione. Si ottiene una forma dell'oggetto che corrisponde all'immagine rovesciata della punta stessa (figura 4). Di conseguenza, maggiore è il raggio della punta, minore risulta la risoluzione della scansione. In figura è rappresentato l'effetto sull'immagine di uno stesso oggetto di due punte aventi dimensioni diverse: in entrambe i casi le reali dimensioni dell'oggetto vengono distorte, ma l'effetto risulta notevolmente minore nel caso della punta avente raggio inferiore.

La risoluzione è strettamente connessa anche ad alcune caratteristiche dell'oggetto (figura 5). Consideriamo due oggetti appuntiti separati da una distanza d , e sottoposti a scansione con una punta avente un certo raggio di curvatura R_c . L'immagine che si ottiene di ciascuno dei due oggetti (che sono più affilati della punta) ha il profilo rovesciato della punta; il volume e la forma dell'immagine totale che si ottiene è data dall'unione dei due profili. Dalla figura si osserva la presenza di un piccolo avvallamento, Δz , tra i due oggetti, determinato dalla forma della punta e dalla distanza d .

Si può definire la risoluzione come la minima distanza d , che due oggetti devono avere affinché l'avvallamento Δz sia significativamente diverso dal rumore strumentale.

Il limite di questa definizione è evidenziato dal seguente esempio. Supponiamo che i due oggetti non abbiano la stessa altezza. Man mano che la differenza di altezza Δh cresce, diminuisce l'avvallamento Δz che si forma tra i due profili.

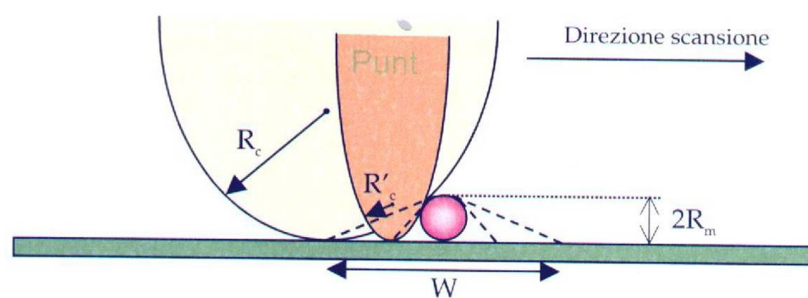


Figura 4: Rappresentazione dell' effetto della punta su oggetti di piccole dimensioni. Maggiore è il raggio della punta, minore è la risoluzione della scansione. In figura è confrontato l'effetto su uno stesso oggetto di due punte aventi raggio di curvatura diverso. In entrambe i casi le dimensioni reali dell'oggetto vengono distorte, ma tale distorsione (W) è minore nel caso della punta avente raggio inferiore (R'_c) rispetto a quella che si ottiene con la punta avente raggio maggiore R_c .

Dunque due oggetti che risultano risolvibili quando hanno la stessa altezza, possono non esserlo se la loro altezza è diversa.

Questo esempio dimostra che la risoluzione nella microscopia a forza atomica è funzione anche della differenza di altezza tra due oggetti vicini.

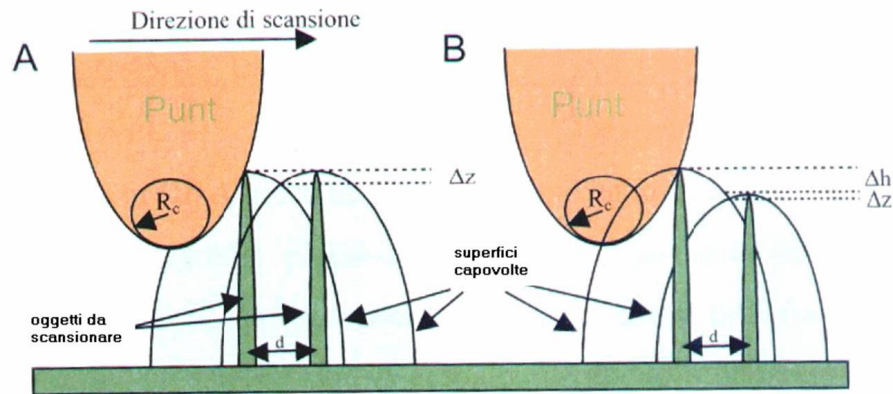


Figura 5 : rappresentazione schematica dei fattori legati alle dimensioni dell'oggetto che ne influenzano la risoluzione. Due oggetti appuntiti separati da una distanza d sono sottoposti a scansione con una punta avente raggio di curvatura R_c . A) I due oggetti hanno la stessa altezza ($\Delta h=0$) e si forma un avvallamento Δz tra i due massimi. B) I due oggetti non hanno la stessa altezza ($\Delta h \neq 0$); al crescere di Δh , diminuisce Δz e gli oggetti risultano meno risolvibili, pur avendo la stessa distanza d rispetto al caso precedente.

FORZE AGENTI TRA PUNTA e CAMPIONE

Durante la scansione del campione, si stabiliscono tra la superficie analizzata e la punta una serie di forze il cui effetto sul campione stesso e sulle immagini che si ottengono dipende da vari fattori quali la loro intensità, il modo operativo, le condizioni sperimentali, la natura del campione, le caratteristiche della punta.

Operando in aria, le principali forze che agiscono sono le forze capillari e quelle di repulsione tra punta e campione.

In condizioni operative normali, ogni campione presenta sulla sua superficie un sottile strato di acqua dovuto all'umidità presente nell'ambiente. La presenza di questo menisco tra punta e superficie origina forze attrattive, chiamate forze di Laplace, che possono arrivare ad una intensità di alcune centinaia di nN; è possibile ridurre la grandezza di queste forze (fino a 1-10 nN) minimizzando l'umidità dell'ambiente di lavoro (35%). Se l'umidità risulta maggiore, operando in contact mode non si ottengono immagini stabili perché i complessi possono essere staccati facilmente dalla superficie. In "*tapping mode*", le molecole non vengono staccate dalla superficie, ma lo strato di umidità pone un limite inferiore all'ampiezza di oscillazione della leva, per evitare che sia catturata dal menisco di liquido.

Operando in liquido, invece si elimina il problema dell'interfaccia tra aria e liquido e si riducono notevolmente le forze capillari.

L'interazione tra punta e campione è dovuta principalmente a forze di Van der Waals ed elettrostatiche, aventi un'intensità compresa tra 0.1-1 nN. Tuttavia, operando in contact mode, anche queste deboli forze possono essere sufficienti a danneggiare il campione.

Queste forze attrattive sono bilanciate dalla repulsione che si stabilisce tra gli atomi della punta e quelli del campione.

PREPARAZIONE E DEPOSIZIONE DEL CAMPIONE

Si preparano 50 μl di campione, diluendo il DNA, nel nostro caso un plasmide di circa 5000 coppie di basi, in un tampone contenente HEPES 4 mM, MgCl_2 2 mM, NaCl 10 mM. Gli ioni Mg^{2+} sono necessari per fare da ponte tra le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA e le cariche negative presenti sulla superficie della mica su cui si depositerà il campione. Senza di essi DNA e mica si respingerebbero impedendo l'adesione dell'acido nucleico alla superficie. La quantità di DNA addizionata al tampone è tale da ottenere una sua concentrazione finale pari a 0.5 nM. Nel caso di campioni in cui sia presente anche il legante sintetico, la concentrazione di questo può variare da 0.5×10^{-6} a 1×10^{-5} M. Il campione così ottenuto viene lasciato a riposo a temperatura ambiente per 5', quindi si procede alla deposizione di una goccia di 20 μl su una superficie di mica sfogliata di fresco. La soluzione viene lasciata a contatto con la mica per 1'30". Il disco di mica viene poi lavato con H_2O milliQ e asciugato con un debole flusso di azoto, prima di essere fissato al piezoelettrico del microscopio e di procedere alla registrazione delle immagini.