

# **KOIRAN PARVOVIRUKSEN FYSIKAALISET OMINAISUUDET**

*Pro gradu-* tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Molekyylibiologian osasto

Helmikuu 2007

Jenni Karttunen

## ALKUSANAT

Tämä pro gradu- tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen molekyylibiologian osastolla.

Haluan kiittää ohjaajiani Markus Ahlskogia, Teemu Ihalaista ja Maija Vihinen-Rantaa. Erityinen kiitos Teemu Ihalaiselle itsenäisen työskentelyn sallivasta, mutta aina taustatuen varmistaneesta ohjauksesta. Paremmiin ei olisi voinut olla. Kiitokset myös tyhmiin kysymyksiin vastanneille huonekavereille Juha Laurilalle ja Einari Niskaselle sekä tasaisesti kaikille muille graduni valmistumiseen jollain tavalla vaikuttaneille ihmisille.

---

**Tekijä:** Jenni Karttunen  
**Tutkielman nimi:** Koiran parvoviruksen fysikaaliset ominaisuudet  
**English title:** Physical properties of the Canine parvovirus  
**Päivämäärä:** 13.2.2007 **Sivumäärä:** 54

**Laitos:** Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
**Oppiaine:** Kemiallinen biologia  
**Tutkielman ohjaajat:** Markus Ahlskog (Prof), Teemu Ihalainen (FM) ja Maija Vihinen-Ranta (Dos)

---

**Tiivistelmä:**

Atomivoimamikroskooppi (AFM) on kasvavassa määrin käytetty työväline biologisessa tutkimuksessa. Sen etuna on mahdollisuus kuvata näytteitä niiden luontaisessa nesteympäristössä ilman näytteen rakenteisiin vaikuttavia vahvoja käsittelyjä. Elastisuusmittaukset ovat AFM:n sovellus, jolla saadaan muiden tekniikoiden ulottumattomissa olevaa tietoa näytteiden elastisuudesta. Koiran parvovirus (CPV) on eräs yksinkertaisimmista eläinviruksista. Viruspartikkeli omaa ikosahedraalisen symmetrian ja sen halkaisija on n. 26 nm. Genomina toimii yksijuosteinen DNA.

Tehty tutkimus oli ensimmäinen suurempi biologista AFM:ää hyödyntävä projekti Jyväskylässä. Yhtenä tarkoituksena olikin kehittää tekniikkaa CPV tutkimuksia varten. Viruspartikkeleita kuvattiin onnistuneesti sekä kuiva- että nesteympäristössä. Kuivassa ympäristössä tehdyillä voimamittauksilla selvitettiin viruspartikkeleiden elastisuutta. Suurimmillaan viruspartikkelin pinta antoi periksi 15 nm, kun sitä painettiin AFM:n kärjellä. Painamisen loputtua partikkeleiden korkeus madaltui enimmillään 3,5 nm. Tästä voimme päätellä viruspartikkelin olevan hyvin elastinen. Lisäksi havaittiin viruspartikkelin kosteusasteella olevan vaikutusta sen elastisuuteen. Tulevaisuudessa olisi mielenkiintoista nähdä, kuinka paljon viruspartikkeleiden elastisuus muuttuu, jos vastaavia mittauksia tehdään nesteympäristössä. Nesteympäristöön laajennetut mittaukset toisivat mukanaan myös paljon uusia sovelluskohteita.

**Author:** Jenni Karttunen  
**Title of thesis:** Physical properties of the Canine parvovirus  
**Finnish title:** Koiran parvoviruksen fysikaaliset ominaisuudet  
**Date:** 13.2.2007 **Pages:** 54

**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Chemical biology  
**Supervisors:** Prof. Markus Ahlskog, M.Sc. Teemu Ihalainen and Docent Maija Vihinen-Ranta

---

**Abstract:**

The atomic force microscope (AFM) has been increasingly employed in biological studies. One of the major advantages of it is the possibility to study biological samples close to their natural environment without disturbing treatments of the sample. Force measurements can bring unique information what other techniques can't reveal. Canine parvovirus (CPV) is one of the simplest animal viruses with a diameter of 26 nm and a single-stranded DNA genome. The CPV capsid structure has icosahedral symmetry.

This study was one of the first biological applications of AFM in Jyväskylä and one of the aims of it was to develop the technique for CPV studies. CPV particles were successfully scanned both in dry and in liquid. AFM force curves were used to investigate elastic properties of CPV. All of the force measurements were made in dry environment. At its best CPV particle height declined 15 nm when pressed with the AFM tip. After the indentation, the height of the particles was reduced only 3,5 nm at highest. This proves that CPV particles are quite elastic. The humidity of the sample was shown to have some effect on the elasticity. In the future it would be interesting to see how elasticity changes if similar measurements are done in liquid environment. Liquid environment would also diversify the possibilities of the research.

---

**Keywords:** Biological AFM, CPV, elasticity

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Koiran parvoviruksen elinkierto ja rakenne</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Atomivoimamikroskopian perusteet</b>	<b>9</b>
1.2.1 Toimintaperiaate	9
1.2.2 Atomivoimamikroskoopilla kuvantaminen	11
1.2.3 Takaisinkytkentä	13
<b>1.3 Biologinen atomivoimamikroskopia</b>	<b>14</b>
1.3.1 Hyödyt ja erot verrattuna muihin tekniikoihin	14
1.3.2 Elastisten ominaisuuksien mittaaminen	15
1.3.3 Muut biologiset sovellukset	16
1.3.4 Näytteiden valmistustekniikat	18
<b>2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS</b>	<b>22</b>
<b>3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Näytteiden valmistus</b>	<b>23</b>
3.1.1 Kuivassa ympäristössä kuvannetut näytteet	23
3.1.2 Nesteympäristössä kuvannetut näytteet	23
<b>3.2 Suoritetut mittaukset</b>	<b>24</b>
3.2.1 AFM kuvantaminen kuivassa ympäristössä	24
3.2.2 AFM kuvantaminen nesteympäristössä	25
3.2.3 Elastisuusmittaukset	25
3.2.4 Elastisuusmittaukset vaihtelevalla amplitudilla	26
<b>3.3 Tulosten analysointi</b>	<b>27</b>
3.3.1 Viruspartikkeleiden korkeuden muuttuminen	27

3.3.2	Sisäänpainuminen mittauksen aikana	27
3.3.3	Energian siirtymisen teho	28
<b>4</b>	<b>TULOKSET</b>	<b>30</b>
4.1	Peruskuvantaminen	30
4.2	Elastisuusmittauksen periaate	34
4.3	Viruspartikkeleiden elastisuusmittaukset	36
4.3.1	Partikkeleiden korkeuden muuttuminen	36
4.3.2	Korkeuden muuttuminen painamisen aikana	38
4.3.3	Energian siirtyminen kärjestä pintaan	40
<b>5</b>	<b>TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>42</b>
5.1	AFM kuvantaminen kuivassa ympäristössä	42
5.2	AFM kuvantaminen nesteympäristössä	43
5.3	Elastisuusmittausten periaate	45
5.4	Partikkeleiden korkeuden muutokset	46
5.5	Energian siirtyminen kärjestä pintaan	49
	<b>LÄHDELUETTELO</b>	<b>51</b>

## LYHENTEET

AFM	(atomic force microscope) atomivoimamikroskooppi
APS	(1-(3-aminopropyl)silatrane) 1-(3-aminopropyli)silatraani
APTES	(aminopropyl triethoxy silane) aminopropyylitrietoksisilaani
BS3	(bis(sulfosuccimidyl) suberate) bis(sulfosukkimidyyli)suberaatti
CPV	(canine parvovirus) koiran parvovirus
GA	(glurataldehyde) glutaraldehydi
HOPG	(highly orientated pyrolytic graphite) korkeasti orientoitunut pyrolyyttinen graffitti
NS-1	(non-structural protein 1) ei-rakenteellinen proteiini 1
NS-2	(non-structural protein 2) ei-rakenteellinen proteiini 2
PBS	(phosphate buffered saline) fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
PDMAAm	(poly(dimethylacrylamide)) poly(dimetyyliakryyliamidi)
PEG	(polyethylene glycol) polyetyleeniglykoli
PFA	(paraformaldehyde) paraformaldehydi
PLL	(poly-L-lysine) poly-L-lysiini
SEM	(scanning electron microscopy) pyyhkäisyelektronimikroskooppi
TEM	(transmission electron microscopy) läpäisyelektronimikroskooppi
VP	(virus protein) virusproteiini

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Koiran parvoviruksen elinkierto ja rakenne

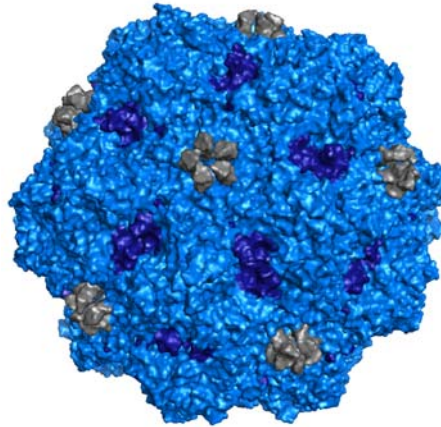
Koiran parvovirus (CPV) on suhteellisen nuori virus ja pian löytämisensä jälkeen vuonna 1978 se aiheutti maailmanlaajuisen pandemian koirilla. CPV kuuluu Parvoviridae-heimoon ja muistuttaa suuresti kissan panleukopeniavirusta, CPV:n onkin arveltu syntyneen sen mutaatioiden seurauksena. Pääasiallisesti CPV infektoi tiettyjä aktiivisesti jakautuvia soluja ja iskee erityisesti sikiöihin tai pentuiässä oleviin koiriin (ks. yleiskatsaus Parrish, C.R., 1990). Virus pääsee solun sisälle sitoutumalla transferriniin reseptoriin, johon liittyneenä matka etenee klatriini päällysteisten vesikkeleiden välityksellä tapahtuvalla endosytoosilla. Kohtaa, jossa virus vapautuu ulos endosytoottiselta reitiltä, ei vielä täsmällisesti tiedetä. Vapautumisen jälkeen virus kulkeutuu mikrotubuluksia pitkin tumaan, jonne se pääsee tumahuokosten kautta (ks. yleiskatsaus Vihinen-Ranta, M. ym., 2004).

Ulkomuodoltaan CPV on n. 26 nm halkaisijaltaan oleva ikosahedraalisen T=1 symmetrian omaava virus (Tsao, J. ym., 1991). Sen yksijuosteinen DNA- genomi koodaa neljää eri proteiinia, joista VP-1 ja VP-2 ovat rakenneproteiineja ja NS-1 ja NS-2 ei-rakenteellisia (ks. yleiskatsaus Parrish, C.R., 1990). NS-proteiinit koodautuvat samasta geenistä, mutta niiden lukuraamit ovat erilliset. Vastaavasti VP- proteiinien erot syntyvät silmukoitumisessa (Jongeneel, C.V. ym., 1986). Näiden lisäksi löytyy myös rakenneproteiini VP-3, joka syntyy täysissä kapsideissa VP-2:n aminopään entsyymaattisen pilkkoutumisen seurauksena.

Viruskapsidi rakentuu 60 symmetrisestä proteiiniyksiköstä, jotka pääasiallisesti koostuvat VP-2 rakenneproteiinista, mutta osaltaan myös VP-1 ja VP-3 proteiineista (ks. yleiskatsaus Cotmore, S.F., ja Tattersall, P., 1987). Kapsidin rakenne sisältää kaksin-, kolmin- sekä viisinkertaisia symmetria-akseleita. Viisinkertaiset akselit ovat sylinterinmuotoisia ja rakentuvat viidestä antiparalleelisesta  $\beta$ -levystä. Jokainen  $\beta$ -levy muodostuu kahdeksasta antiparalleelisesta juosteesta, jotka ovat kiinnittyneitä toisiinsa vetysidoksilla. Viisinkertaisia symmetria-akseleita ympäröi n. 11 Å leveä kanjonimainen rakenne. Sylinterirakenteen juosteita erottaa neljä suurta silmukkaa, jotka rakentuvat VP2-proteiinista. Silmukat vaikuttavat paljon kapsidin oikeanlaiseen kokoamiseen sekä



morfologiaan. Kapsidin pintarakenne koostuu suurimmaksi osaksi näistä silmukoista ja ne muodostavat kolminkertaisille symmetria-akseleille 22 Å pitkät piikkimäiset rakenteet, joiden väleissä on kaksinkertaisella symmetria-akselilla sijaitsevia painaumia (Hurtado, A. ym., 1996, Tsao, J. ym., 1991). Parvoviruspartikkelin isoelektrinen piste on n. 5,2, mistä voi päätellä partikkelin omaavan negatiivisen kokonaisvarauksen (Yuan, W., ja Parrish, C.R., 2001/1/20). Kuvassa 1 on cpv-partikkelin rakenne mallinnettuna.



Kuva 1: Koiran parvovirus. Harmaana näkyvät viisinkertaiset symmetria-akselit ja tummemmalla sinisellä kaksinkertaisten symmetria-akseleiden painaumat. Mallinnettu PY mol-ohjelmalla Simpson ym. (2000 J. Mol. Biol.) ratkaiseman rakenteen 1C8D mukaisesti.

## 1.2 Atomivoimamikroskopian perusteet

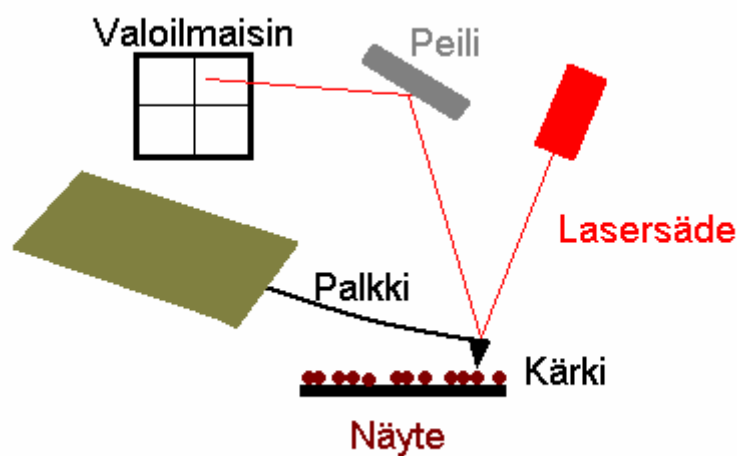
Atomivoimamikroskoopin (Atomic force microscope, AFM) toiminta perustuu nimensä mukaisesti atomien välisiin voimiin ja vuorovaikutuksiin. Niitä hyödyntämällä kyetään kuvaamaan näytteen pinnan korkeutta alle nanometriluokan resoluutiolla ja tyhjiössä mitattuna erottamaan jopa yksittäisiä atomeja. AFM kehitettiin tunnelointimikroskoopista vuonna 1986 (Binnig, G. ym., 1986). Hyvin nopeasti tämän jälkeen laitetta alettiin käyttää myös biologisissa sovelluksissa. Biologisia tutkimustuloksia julkaistiin jo 1980-luvun lopulla, mutta 1990-luvulla laite vakiinnutti lopullisesti paikkansa biologien työvälineenä (ks. yleiskatsaus Hansma, H., ja Pietrasanta, L., 1998).

### 1.2.1 Toimintaperiaate

AFM- laitteisto koostuu mittauslaitteesta, kontrollereista sekä tietokoneesta. Mittauslaite suorittaa käytännön mittaustoimet. Kontrollereiden kautta kulkee tieto mittauslaitteen ja

tietokoneen välillä. Ne ohjaavat mittauslaitetta ja suodattavat syntyvää tietovirtaa lopulta välittäen sen tietokoneelle havainnoitavassa muodossa. Tietokone on käyttäjän toiminnan kannalta tärkein osa, sen avulla hallinnoidaan mittaustilannetta ja säädetään useimmat asetukset (ks. yleiskatsaus da Silva, L.P., 2002).

Kuvassa 2 on kaavio AFM:n toimintaperiaatteesta. Mittauksen perusta on palkissa kiinni oleva kärki, joka kulkee näytteen pinnalla sen muotojen mukaan. Parhaimmillaan kärjen pää voi olla jopa atomin terävyysluokkaa ja se tunnistaaakin näytteen pinnan atomien välisten kemiallisten vuorovaikutusten avulla (Binnig, G. ym., 1986). Nämä vuorovaikutukset voivat olla sekä repulsiivisia että attraktiivisia, niitä on mallinnettu mm. Lennard-Jones potentiaalin (kuva 3) avulla (Gould, S.A. ym., 1989). Mukaillessaan näytteen pintaa kärki aiheuttaa palkin taipumisen, jota mitataan palkin päälle kohdennetulla lasersäteellä. Lasersäde taittuu palkin pinnalta ja kulkee peilien kautta valoilmaisimelle, joka havainnoi laserin kulman muutosta ja näin ollen kerää tietoa palkin taipumisesta (ks. yleiskatsaus da Silva, L.P., 2002).



Kuva 2: Kaaviokuva atomivoimamikroskoopin toimintaperiaatteesta. Mittasuhteet eri osien välillä eivät ole oikeat.

Pietsosähköiset elementit ovat tärkeä osa mikroskooppia. Elementti koostuu x-, y- ja z-pietsoista, jotka huolehtivat liikkeestä omiin suuntiinsa. Pietsoelementin fyysiset mitat ovat verrannollisia siihen johdettuun jännitteeseen ja jännitettä kontrolloimalla voidaan hallitusti liikuttaa näytettä ja kärkeä alle ångströmin tarkkuudella. AFM:n tarkka resoluutio ja toiminta perustuvat suurelta osin juuri tähän mekanismiin. Skanneri voi

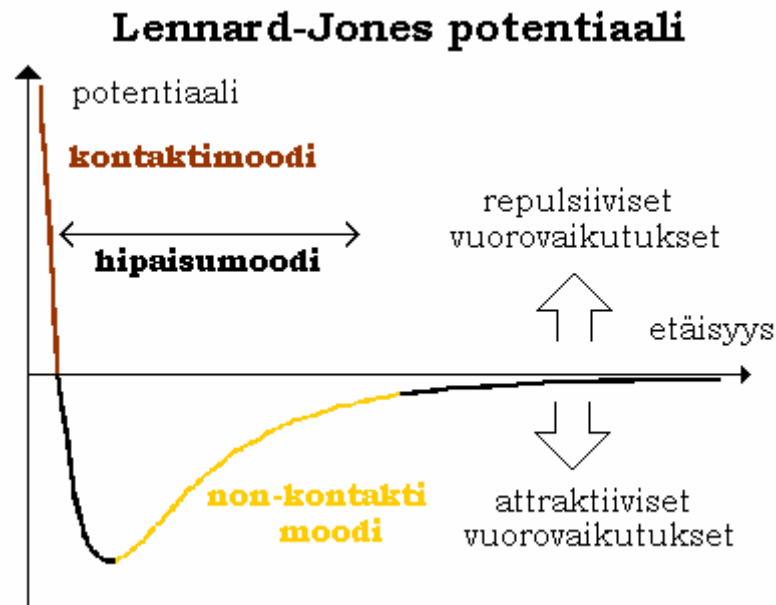
koostua kolmesta erillisestä pietsoelementistä, joista jokainen kontrolloi liikettä omaan koordinaattisuuntaan. Toinen vaihtoehto on putkiskanneri (tube scanner), jossa kaikki kolme liikkumissuuntaa kontrolloituvat saman pietsoelementin välityksellä. Liikesuunnat syntyvät elementin eri puolille kiinnitettyihin elektrodeihin johdetun jännitteen avulla (ks. yleiskatsaus Hansma, P.K. ym., 1988).

### 1.2.2 Atomivoimamikroskoopilla kuvantaminen

Kuvantaminen onnistuu useammalla eri tekniikalla eli moodilla. Erot tekniikoiden välillä syntyvät pääasiassa kärjen ja näytepinnan kontaktin laadusta ja siihen vaikuttavista voimista. Kuvassa 3 näkyvä Lennard-Jones potentiaali kuvaa vuorovaikutuksia kahden atomin välillä. Vuorovaikutukset syntyvät pikkuhiljaa atomien etäisyyden pienentyessä. Aluksi vuorovaikutukset ovat positiivisia van der Waalsin vuorovaikutuksia. Etäisyyden edelleen pienentyessä muuttuvat vuorovaikutukset kuitenkin negatiiviseksi Paulin kieltosäännön mukaisen elektronipilvien repulsion vuoksi.

Peruskuvantamistekniikoita on kolme erilaista, joista kontaktimoodi on ensimmäisenä kehitetty. Siinä kuvauskärki on nimensä mukaisesti koko ajan kontaktissa näytteen pinnan kanssa ja liikkuu tuntemiensa repulsiivisten vuorovaikutusten ohjaamana (Binnig, G. ym., 1986). Kontaktimoodin haittapuolena on näytteen mahdollinen vahingoittuminen, varsinkin jos näytteessä on suuria korkeuseroja. Toinen suosittu kuvantamistapa on nk. hipaisumoodi, joka soveltuu parhaiten biologisten näytteiden kuvantamiseen. Se on hellävarainen ja resoluutio on kontaktimoodin luokkaa, sillä kärki tunnistaa pinnan kontaktimoodin tapaan osaltaan repulsiivisten vuorovaikutusten avulla. Kuvantaminen perustuu määrättyllä taajuudella kärkeen ajettuun värähtelyyn, jonka johdosta kärki ”hakkaa” näytteen pintaa. Kärki ja näytteen pinta ovat kontaktissa vain ajoittain. Värähtelyn johdosta palkkiin suunnattu lasersäde liikkuu koko ajan vakioamplitudilla, joka muuttuu näytteen muotojen muuttuessa. Hipaisumoodi sopii sekä kuiva- että nesteympäristössä kuvantamiseen. Kolmas, vähiten käytetty kuvantamistapa on non-kontaktimoodi. Tekniikka toimii hipaisumoodin tavoin, mutta siinä kärki tunnistaa pinnan kauempana vaikuttavien attraktiivisten van der Waals voimien avulla. Kärki ja näytepinta eivät siis ole kontaktissa ollenkaan, mikä tekee tekniikasta hyvin hellävaraisen. Tästä johtuen hyvän resoluution saavuttaminen on paljon vaikeampaa kuin muilla

kuvaustekniikoilla. Lisäksi kuvaus ei onnistu nesteessä, sillä vuorovaikutukset ovat liian heikkoja vastustamaan vesiympäristön vaikutusta (ks. yleiskatsaus Ricci, D., ja Braga, P.C., 2004a).



Kuva 3: Lennard-Jones potentiaali ja eri kuvausmoodien käyttämät voimat.

Värähtelyyn perustuvissa moodeissa kuvausvoimaa säädelään amplitudin suuruudella ja sen kynnsarvon (amplitude setpoint) asetuksella. Amplitudin kynnsarvolla määritetään haluttu korkeus, jolla palkki ja näin ollen kärki on näytteestä. Mitä korkeampaa voimaa käytetään, sitä parempi kuvaustulos on tiettyyn pisteeseen asti. Liian suuri kuvausvoima voi kuitenkin vahingoittaa kärkeä ja näytettä, erityisesti jos kyseessä on biologinen pehmeä näyte (ks. yleiskatsaus Hansma, P.K. ym., 1988).

Kuvauskärki on yksi atomivoimamikroskoopin tärkeimmistä osista ja sen vaikutus tulokseen on suuri. Suosituimpia kärkimateriaaleja ovat pii ja piinitridi  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Yleensä kärki on kartiomainen ja sen huipun terävyys voi parhaimmillaan olla 1 nm ja kartion kulma vastaavasti 30-40°. Käytännössä kärjen pään halkaisija on usein päälle 10 nm (Sheng, S. ym., 1999). Tarkimman ja totuudenmukaisimman kuvaustuloksen saa, kun kärki on kuvauskohdetta paljon terävämpi. Jos kärjen pään halkaisija on suurempi kuin tutkittava näyte, vaikuttaa se paljon kuvan muodostumiseen. Pienien kohteiden kuvantamisessa onkin yleistä, että kuvassa näkyvät muodot ovat paljon kohteen todellista kokoa suurempia. Reunojen leventyminen ei ole yleensä este luotettavalle kuvantamiselle. Kärjen

ja näytepinnan väliset vuorovaikutukset aiheuttavat myös aina pientä virhettä kuvaan. Toinen yleinen ongelma on kaksois- tai kolmoiskärki, jossa kärki on jakautunut useampaan terävään osaan. Vääristyneestä muodosta johtuen kaikki muodot kuvassa toistuvat kaksin- tai kolminkertaisina. Kärki voi muuttua kuvantamisen aikana esimerkiksi murtumalla tai se voi likaantua näytepinnan molekyyleistä, jolloin kuvassa alkaa näkyä toistuvia epänormaaleja muotoja (ks. yleiskatsaus Ricci, D., ja Braga, P.C., 2004b). Kärjen lisäksi tärkeä osa on palkilla, jossa kärki on kiinni ja erityisesti sen jousivakiolla. Mitä taipuvampi palkki on, sitä heikompia värähdyksiä se havaitsee. Jäykemmät palkit takaavat tarkan kuvaustuloksen, mutta vastaavasti mittauksessa tarvittava voima on suurempi (Hansma, P.K. ym., 1988).

Palkin värähtelyyn perustuvissa tekniikoissa kuva voi muodostua kolmella tavalla, joista jokainen tarjoaa hieman erilaista tietoa näytteestä. Korkeus-kuva tallentuu z-pietson konkreettisesta liikkumisesta, jolloin se tallentaa laitteen määrittämän palkin korkeuden kullakin hetkellä. Amplitudi-kuva piiryy detektorin havaitsemasta värähtelyn amplitudista, joka vaihtelee z-pietsoa nopeammin näytteen korkeuden muuttuessa. Tämän seurauksena amplitudi-kuvasta erottuvat erityisen hyvin reunat ja muut rakenteet, joiden kohdalla muutokset amplitudissa ovat suurimmat (ks. yleiskatsaus Ricci, D., ja Braga, P.C., 2004a). Vaihe-ero syntyy laitteelle ajetun ja mitatun amplitudin välille. Muutokset tässä erossa tallentavat vaihe-kuvaa ja siinä voi nähdä mm. eroa erilaisten kuvattavien pintojen välillä (Magonov, S.N. ym., 1997/4/1).

### 1.2.3 Takaisinkytkentä

Valittu amplitudin kynnsarvo pysyy vakiona takaisinkytkennän avulla. Takaisinkytkentä säätelee kärjen korkeutta z- pietson välityksellä. Säättely tapahtuu pinnan muotojen mukaisen palkin taipuman antaman informaation (kontaktimoodi) tai amplitudin muutoksen (hipaisumoodi) avulla ja se toimii kahden eri vahvistus- asetuksen avulla. Ensimmäinen on suhteellinen vahvistus (proportional gain, kaavassa P), jolla määritetään kerroin korjausliikkeen nopeudelle:

$P \times (\text{haluttu korkeus} - \text{nykyinen korkeus})$

Mitä suurempi ero haluttuun on, sitä nopeammin korjausliike toimii. Kun ero pienenee, myös korjauksen nopeus pienenee samassa suhteessa. Jos vahvistuksen valittu arvo on korkea, korjaus toimii nopeasti eron ollessa suuri, mutta vastaavasti nopeammin myös pienissä eroissa. Tällöin korjaus ei ehdi pysähtyä oikean arvon kohdalla ja aiheuttaa epätarkkuutta. Toisaalta arvon ollessa pieni korjaus ei mene yli, mutta on liian hidasta korkeammissa eroissa, eikä kykene vastaamaan halutulla nopeudella muutoksiin.

Lähellä oikeaa arvoa tapahtuvaan säätelyyn vaikuttaa integraalinen vahvistus (integral gain, kaavassa I), joka summaa muutoksen ajan funktiona:

$$I \times \sum_i (\text{haluttu korkeus} - \text{nykyinen korkeus})$$

Integraalinen vahvistus tarkkailee siis pidemmällä aikavälillä tapahtunutta virhettä ja pyrkii korjaamaan sen. Koska integraalinen vahvistus suorittaa hienosäädön lähellä haluttua arvoa, on se käytännön mittaustilanteessa tärkein ja eniten käytetty vahvistusasetus. Yleisesti vahvistusasetusten kanssa pyritään löytämään sopiva arvo, jossa maksimoidaan takaisinkytkennän toimivuus, mutta minimoidaan liian suurten asetusten aiheuttamat muutokset kuvan tarkkuudessa (ks. yleiskatsaus Barr, M., 2002).

### **1.3 Biologinen atomivoimamikroskopia**

#### **1.3.1 Hyödyt ja erot verrattuna muihin tekniikoihin**

AFM:n sovellukset tuovat paljon uusia mahdollisuuksia biologiseen tutkimukseen. Eräs sen tärkeä ominaisuus on monipuolisuus eri olosuhteiden kannalta. Näyte voi olla kuiva- tai nesteympäristössä. Kuvantaminen onnistuu myös eri ilmanpaineissa tai luoduissa ilmakehissä, esimerkiksi typpi-atmosfäärissä. Erityisesti nesteympäristö mahdollistaa biologisten näytteiden tutkimisen niiden luontaisessa olotilassa sekä näiden olosuhteiden hallitun muuntelun esimerkiksi eri pH-arvoisilla puskureilla (ks. yleiskatsaus Zhifeng Shao ym., 1996).

Näytteen valmistus erottaa AFM:n muista kuvantamismenetelmistä, sillä tekniikka asettaa vaatimuksia vain kuvattavan näytteen koolle. Pyyhkäisyelektronimikroskooppia (scanning electron microscope, SEM) ja läpäisyelektronimikroskooppia (transmission electron microscope, TEM) on käytetty paljon rakennetutkimuksessa. Molemmista tekniikoissa

näyte pitää vähintäänkin fiksoida ja kuivata. Tämän lisäksi TEM-näytteiden tulee olla hyvin ohuita, jotta elektronisuihku voi ne lävistää. SEM:ssä näytteen tulee olla elektronisesti johtava, joten usein se päällystetään kullalla tai vastaavalla materiaalilla (ks. yleiskatsaus Crawford, B.J., ja Burke, R.D., 2004). Röntgensädekristallografia on myös suosittu rakenteiden kuvantamismenetelmä ja sen tarkkuus on paljon AFM:ää suurempi. Näytteen valmistus vaatii kuitenkin paljon, sillä laite kykenee tutkimaan vain kiteytyneitä rakenteita. Ongelmaksi muodostuu rakenteiden mahdollinen muuttuminen kiteytyksen seurauksena, joidenkin näytteiden osalta kiteytys ei puolestaan edes onnistu (ks. yleiskatsaus Dauter, Z., 2006). AFM:n ”esi-isä” tunnelointimikroskoopi vaatii myös johtavan näytepinnan (Binnig, G. ym., 1986). Jokaisella tekniikalla on omat hyvät ja huonot puolensa. Kuvantamisessa AFM ei korvaa muita tekniikoita, mutta osaltaan täydentää ja tarjoaa uudenlaista tietoa.

AFM ei ole ainoastaan kuvantamistekniikka, sen muut sovellukset ovatkin yhä enemmän käytettyjä biologian puolella. Sovellutuksilla voidaan selvittää erilaisia fysikaalisia ominaisuuksia, kuten elastisuutta tai sidosvoimia molekyylien välillä. Suurena etuna on mahdollisuus yhdistää nämä kaksi eri puolta laitteesta. Kuvantamisella pystytään varmistamaan, että mittaukset suoritetaan juuri haluttuun kohtaan näytettä ja muutoksia voidaan tarkkailla sekä numeeristen tulosten että kuvassa näkyvien konkreettisten muutosten avulla. AFM onkin hyvin monipuolinen tekniikka, jonka mahdollisuuksista kannattaa ottaa kaikki hyöty irti (ks. yleiskatsaus Zhifeng Shao ym., 1996).

### 1.3.2 Elastisten ominaisuuksien mittaaminen

Eräs AFM:n paljon käytetty sovellutus on elastisuusmittaukset, jossa kärjellä painetaan näytettä halutusta kohdasta. Painelun suuruutta säädellään palkin taipuman avulla, jolle asetetaan mittauksessa maksimiarvo. Painuminen pysähtyy, kun palkki on taipunut tähän arvoon. Painelussa käytetty voima saadaan selville kärjen jousivakion ja palkin taipumismäärän avulla. Jousivakio määrittää kärjen taipuisuutta, sen yksikkönä toimii N/m. Mittauksessa käytetty voima saadaan laskettua Hooken lain (kaava 1) avulla, sillä pienillä taipuman arvoilla palkki käyttäytyy ideaalijousen tavoin. Substraatin painuminen vaikuttaa voimaan myös hieman.

$$\text{voima [N]} = \text{jousivakio [N/m]} \times \text{taipuma [m]} \quad [1]$$

Hyödyllisin tulos mittauksesta on taipumakuvaaja, joka näyttää palkin taipumisen z-pietson liikkeen funktiona. Sen avulla voidaan määrittää, kuinka paljon kärjen alla oleva rakenne antaa periksi painamisen tuloksena. Palkin jousivakiota kovempi pinta ei yleensä painu yhtään, jolloin taipuman suuruus muuttuu samassa suhteessa z-pietson liikkeen kanssa. Eli z-pietson liikkuaessa 1 nm alemmas myös palkin taipuma suurenee 1 nm. Jos kärjen alla on pehmeämpää materiaalia, kuten viruspartikkeli, ei tämä suhde pidä enää paikkansa. Kun voima kasvaa tarpeeksi suureksi, antaa pinta periksi palkin taipumisen sijasta. Tässä tapauksessa voisi esimerkiksi 1 nm palkin taipuminen vaatia 2 nm liikkumisen z-pietsoilta (ks. yleiskatsaus Radmacher, M., 2002). Pinnan periksi antamista voidaan havainnollistaa taipumakuvaajasta lasketulla kulmakertoimella. Alkaen kohdasta, jossa kärki on kontaktissa pinnan kanssa ja palkki alkaa taipua, saadaan kulmakerroin palkin taipumisen ja z-pietson liikkeen suhteelle. Jos pinta ei anna periksi, kulmakerroin on noin 1. Pehmeämmissä painelukohteissa pinnan periksi antaminen alentaa kulmakerrointa, sillä z-pietson on liikuttava pidemmälle aiheuttaakseen vastaavan taipuman palkissa. Yleensä pehmeän näytteen pinnan periksi antaminen ei ole lineaarista, vaan voi tapahtua hyppäyksittäin rakenteiden romahtaessa. Tämän vuoksi pelkkä kulmakerroin ei välttämättä kuvaa hyvin tilannetta, mutta sen avulla voidaan luoda yleiskuva mittauksen onnistumisesta ja paineluiden osumisesta haluttuun kohtaan (Michel, J.P. ym., 2006).

Painelukokeiden avulla voidaan selvittää, onko pinta elastinen, eli palautuuko se ennalleen painamisen jälkeen vai plastinen, jolloin pinta jää painuneeksi. Ääritilanteet huomaa selvänä erona pinnan lähestymis- ja loittonemiskäyrissä taipumakuvaajassa. Jos käyrät ovat identtisiä molempiin suuntiin mentäessä, palautuu pinta takaisin eli on elastinen. Plastisen pinnan loittonemiskäyrä saavuttaa nollataipuman aiemmin kuin vastaava lähestymiskäyrä (ks. yleiskatsaus Radmacher, M. ym., 1996). Pidemmällä aikavälillä tapahtuvaa palautumista voidaan tarkkailla myös painetun partikkelin korkeuden tai profiilin muutoksista ennen ja jälkeen painamisen.

### 1.3.3 Muut biologiset sovellukset

Atomien väliset heikot vuorovaikutukset ovat biologisissa systeemeissä hyvin tärkeässä roolissa. Niiden avulla tapahtuvat kaikki sitoutumiset ja molekyyli-tunnistus esimerkiksi



vasta-aineen ja epitoopin, komplementaaristen DNA-juosteiden sekä reseptorin ja ligandin välillä. AFM tarjoaa hyvän välineen tutkia voimaa näiden sitoutumisten välillä ja monia eri sovelluksia aiheesta on kehitetty.

Eräs paljon tutkittu kohde on avidiini-biotiini molekyylipari, jonka sidoksen kestävyys on korkeimpia tunnettuja biologisissa vuorovaikutuksissa. Samalla on kehitetty yleispätevää keinoa sidosvoimien tutkimiseen. Käytännössä sidosvoiman tutkiminen tapahtuu kiinnittämällä toinen tutkittavasta molekyyliparista kärkeen ja toinen näytepintaan. Kiinnityksen tulee luonnollisesti olla voimakkaampaa kuin tutkittava sidos, joten yleensä kovalenttinen kiinnitys on tarpeellista. Mittaus suoritetaan normaalin voimamittauksen tapaan, poikkeuksena tarkkaillaan palkin taipumaa näytteestä loitonemisen aikana ja selvitetään voima, jolla sidos katkeaa ja vuorovaikutus lakkaa (Florin, E.L. ym., 1994, Lee, G.U. ym., 1994).

Edellä kuvattu yksinkertainen menetelmä sidosvoiman mittaamiseen ei sovellu kaikille molekyylipareille. Ongelma syntyy kärjen ja näytepinnan välisistä ylimääräisistä vuorovaikutuksista, jotka lisäävät mitattavaa voimaa ja peittävät halutun molekyyliparin vuorovaikutuksia (Stuart, J.K., ja Hlady, V., 1995). Ratkaisu ongelmaan on tarkoitukseen suunniteltu linkkerimolekyyli. Esimerkiksi vasta-aineen ja antigeenin välisiä vuorovaikutuksia selvittävässä tutkimuksessa kiinnitettiin vasta-aine kärkeen sekä antigeeni näytepintaan kiinni polyetyleeniglykolin (PEG) avulla. Tämä ehkäisee ylimääräisiä sidoksia huomattavasti, sillä linkkerimolekyyli erottaa tutkittavan sitoutumisen sekä kärjestä että pinnasta, jolloin ylimääräisiä sidoksia ei pääse muodostumaan. Linkkerimolekyylin käyttö mahdollistaa myös molekyylien vapaamman liikkumisen ja näin ollen sitoutuminen tapahtuu paljon luonnollisemmalla tavalla kuin vastinparien ollessa kiinteästi kiinni pinnoissa (Hinterdorfer, P. ym., 1996). Myös muita vastaavia linkkereitä on kehitelty. Uusimpien joukossa on UV-valon avulla polymerisoidut poly(dimetyyliakryyliamidi) (PDMAAm) linkkerit, joiden pituuteen voi polymerisoinnin avulla vaikuttaa. Pidemmän linkkerin avulla saadaan paremmin tutkittua yksittäisten vastinparien sidosenergiaa, sillä useampien sitoutuneiden vastinparien tapauksessa eri parit irtoavat pidemmällä aikavälillä johtaen lopulta vain yhteen sitoutuneeseen vastinpariin (Idiris, A. ym., 2005).

Voimamittausten lisäksi AFM:ää voi käyttää myös peruskuvantamisen osalta erilaisiin sovelluksiin, joiden ensisijaisena tarkoituksena ei ole rakennetutkimus. Nämä sovellukset käyttävät hyväkseen AFM:n mahdollisuutta kuvantaa oikeissa fysiologisissa olosuhteissa ja näin ollen mahdollistaa reaaliajassa tapahtuvien muutosten tarkkailun. Kuvantamalla voidaan näkemällä todeta reseptorin ja ligandin sitoutumista. Tarpeeksi suurella resoluutiolla nähdään sitoutumiskohta ja mahdollinen vaihtelu siinä, kuten myös sitoutumisen aiheuttamat muutokset konformaatioissa (Hussain, M.A. ym., 2005). Kuvantamisen avulla on selvitetty myös parvovirukseen sitoutuvien transferriinireseptoreiden lukumäärää (Ihalainen ym. julkaisematon tulos). Eräs kaupallinen sovellus on ViriChip, kehittämissä oleva menetelmä virusten havaitsemista varten. Valmistetun sirun pinta koostuu vasta-aineista, joihin määrätyt viruspartikkelit voivat sitoutua. AFM-kuvaamisella nähdään sitoutuneet partikkelit ja voidaan määrittää, sisältääkö näyte tutkittuja viruksia. Tekniikka on nopea ja se havaitsee pienetkin virusmäärät hyvin. Kehittyessään se voi osoittautua toimivaksi vaihtoehdoksi muille käytettäville tekniikoille (Nettikadan, S.R. ym., 2003).

#### **1.3.4 Näytteiden valmistustekniikat**

Näytteen valmistus on olennainen osa AFM-kuvantamista. Koska kuvan resoluutio on hyvin korkea, jopa ångströmin suuruinen liike kuvannettavassa kohteessa voi heikentää resoluutiota (ks. yleiskatsaus Haggerty, L., ja Lenhoff, A.M., 1993). Erityisen tärkeää näytteen valmistus on biologisissa sovelluksissa. Eri makromolekyylit reagoivat vaihtelevasti samoihin käsittelyihin, joten jokaiselle näytteelle on kokeiltava parhaiten soveltuva tekniikka. AFM:n etuna moniin muihin biologisiin kuvantamistekniikoihin on mahdollisuus säilyttää näyte natiivissa tilassaan. Biologisten näytteiden valmistus onkin tasapainoilua kahden ääripään välillä: näytteen tulee kiinnittyä näytepintaan tarpeeksi kovaa, jotta se ei irtoaisi tai liikkuisi. Toisaalta kiinnityksen tulee olla niin hellävaraista, että se ei vaikuta liian paljoa näytteen rakenteeseen ja näin aiheuta vääriä tuloksia (ks. yleiskatsaus Zhifeng Shao ym., 1996).

Ensimmäinen vaihe näytteen valmistuksessa on löytää tarpeeksi sileä pinta, jolle näyte voidaan kiinnittää. Koska näytettä kuvataan nanometriluokan resoluutiolla, tulee käytetyn pinnan olla tätä paljon tasaisempi (ks. yleiskatsaus El Kirat, K. ym., 2005). Näytepintoja

voidaan käyttää sellaisenaan tai niitä voidaan kemiallisesti muokata ja aktivoida (ks. yleiskatsaus Zhifeng Shao ym., 1996). Yleensä näyte tarttuu pintaan elektrokemiallisten vuorovaikutusten avulla, joten niiden kemiallinen koostumus on tiedettävä. Käytännössä kaikki biologiset makromolekyylit sisältävät varauksia nesteympäristössä, jossa pintaan kiinnitys yleensä tapahtuu. Nesteessä olevien ionien koostumus vaikuttaa hyvin paljon vuorovaikutuksiin ja sitoutumiseen. Tämä tulee esille erityisesti nestekuvauksessa, jossa puskurien ionikoostumus saattaa vaikuttaa paljonkin näytteen kiinni pysymiseen. Tällaisissa tapauksissa näytteen kovalenttinen kiinnitys pintaan on usein pakollista (ks. yleiskatsaus Muller, D.J. ym., 1997).

Mineraalikiilteet (mica) toimivat hyvin näytepintana. Ne ovat kerroksittain rakentuvaa johtamatonta materiaalia. Yleisin käytetty mineraalikiille on muskoviitti  $\text{KAl}_2(\text{OH})_2\text{AlSi}_3\text{O}_{10}$ . Mineraalikiilteen päällimmäisen kerroksen saa helposti lohkaistua, eli poistettua, esimerkiksi teipin avulla. Tuloksena syntyy puhdas, jopa atomitasolla sileä pinta. Yhden kerroksen korkeus on n. 1 nm, joka on suurin mahdollinen porraskorkeus pinnassa, kun lohkaus on tehty huolella (ks. yleiskatsaus El Kirat, K. ym., 2005). Syntynyt pinta on negatiivisesti varautunut ja biologiset näytteet yleensä kiinnittyvät siihen hyvin. Mineraalikiilteet ovatkin biologisissa sovellutuksissa eniten käytetty näytepinta, niiden puolesta puhuvat toimivuuden lisäksi halpa hinta ja helppokäyttöisyys (ks. yleiskatsaus da Silva, L.P., 2002).

Lasi on toinen varteenotettava vaihtoehto näytepinnaksi. Se ei ole yhtä tasainen kuin mineraalikiille, mistä johtuen pienimpien näytteiden kuvaaminen voi olla vaikeaa. Lasia ei myöskään voi lohkaista, joten sen pinta pitää puhdistaa kemiallisilla keinoilla. Yleisintä kontaminaatiota aiheuttavat ilmasta tarttuneet orgaaniset molekyylit, joiden poistaminen tapahtuu happokäsittelyllä ja vesiliuoksen ultrasonikoinnilla (Karrasch, S. ym., 1993). Puolijohdeteollisuuden käyttämät piilevyt (silicon wafers) sopivat myös näytepinnaksi. Näytepintana voidaan käyttää myös hydrofobista korkeasti orientoitunutta pyrolyyttistä graffittia (highly orientated pyrolytic graphite, HOPG). Biologisten näytteiden valmistuksessa on kuitenkin havaittu useita ongelmia, joiden vuoksi HOPG ei ole saavuttanut suurta suosiota (ks. yleiskatsaus El Kirat, K. ym., 2005).

Ongelmana suosituimmissa näytepinnoissa on se, että näytteet kiinnittyvät niihin heikkojen vuorovaikutusten avulla. Jos halutaan kovalenttista kiinnitystä, pitää lasi tai mineraalikiille

päällystää toisella materiaalilla. Kulta on käytetty paljon tähän tarkoitukseen, se saadaan kiinnittymään pintaan esimerkiksi höyrystämällä (vapor deposition) tai epitaksiaalisesti kasvatettuna pintaan. Epitaksiaalisella kasvatuksella saadaan aikaan hyvin tasainen pinta, vaihtelut pinnan korkeudessa ovat vain 0,2-0,5 nm luokkaa. Kulta on kemiallisesti toimiva näytepinta, sillä se vastustaa hyvin hapettumista ja radikaalien hyökkäyksiä. Pinta sitoo hyvin orgaanisia tioleja ja bifunktionaalisia disulfideja, joiden avulla biologiset makromolekyylit saadaan kiinnitettyä kovalenttisesti (Hegner, M. ym., 1993). Yleinen ja yksinkertainen tapa muokata näytepintaa on käsittely poly-L-lysiinillä. Käsittely muuttaa pinnan positiivisesti varautuneeksi ja näin ollen parantaa paljon negatiivisia varauksia omaavien yhdisteiden sitoutumista (ks. yleiskatsaus Muller, D.J. ym., 1997). Toinen paljon käytetty pinnoiteryhmä on erilaiset silaaniyhdisteet. Aminopropyylitrietoksisilaani (APTES) sitoutuu substraattiin ja sen aminoryhmät muodostavat positiivisesti varautuneen pinnan. Biologiset molekyylit sitoutuvat tähän uuteen pintaan yleensä kovalenttisesti ja kiinnittyvät hyvin. Tekniikan ongelmana on vapaiden aminoryhmien uudelleen reagointi, joka aiheuttaa epätasaisuuksia pintaan ja estää näytettä kiinnittymästä (Karrasch, S. ym., 1993). Pidemmälle kehitetty APTES:n johdannainen on 1-(3-aminopropyyli)silatraani (APS). Myös APS:n toiminta perustuu vapaana oleviin aminoryhmiin, mutta sitoutuneena molekyyli on paljon stabiilimpi ja sen käsittely on helpompaa APTES:iin verrattuna (Shlyakhtenko, L.S. ym., 2003).

Erilaisten kahdenarvoisten epäorgaanisten kationeiden läsnäolo voi suuresti parantaa näytteen tarttumista pintaan. Kationit muodostavat suolasillan pinnan ja näytteen välille, tämä vahvistaa sitoutumista ja näin saavutetut heikot vuorovaikutukset voivat kestää jopa nesteessä kuvaamisen. Kationin ionisäde vaikuttaa sen kykyyn toimia suolasiltana. Pienemmän säteen omaavat kationit toimivat parhaiten, suuremmalla säteellä varustetut kationit eivät enää vaikuta sitoutumiseen merkittävästi (Hansma, H.G., ja Laney, D.E., 1996).

Äärimmäisenä toimenpiteenä näytteen rakenteita voidaan vahvistaa siltamolekyylien välityksellä. Molekyylit muodostavat kovalenttisiä sidoksia molemmista päistään ja tällä tavoin tekevät tuetusta rakenteesta kestävämmän. Yleisesti tekniikkaa käytetään menetelmissä, joissa rakenteen halutaan säilyvän ehjänä ja ”jäähmettyvän” paikoilleen (ks. yleiskatsaus Kluger, R., ja Alagic, A., 2004). Tämä auttaa huonosti sitoutuvien näytteiden

kohdalla myös AFM:ssä, erityisesti nesteympäristössä, jossa kiinnityksen tulee olla luja. Kuvannettavat partikkelit tarttuvat pintaan kiinni paremmin siltamolekyylien välityksellä, samalla niiden rakenne jähmettyy, jolloin kuvantaminen helpottuu. Eräs suosittu siltamolekyyli on glutaraldehydi (GA), joka toimii hyvin vaihtelevissa olosuhteissa ja sitoo monenlaisia rakenteita (ks. yleiskatsaus Migneault, I. ym., 2004).

## 2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Biologinen AFM on kehittyvä ala, jonka käyttö on Suomessa vielä hyvin vähäistä. Tämän tutkimuksen yleisenä tarkoituksena on aloittaa ja kehittää atomivoimamikroskoopin käyttöä biologisessa tutkimuksessa Jyväskylän yliopistossa. Tämä pro gradu- tutkielma on ensimmäinen AFM:ää työvälineenä hyödyntävä kokonaisuus biologian alalla.

Käytännössä tutkimuskohteena on koiran parvovirus. Viruspartikkeleita kuvannetaan sekä niiden kestävyyttä pyritään selvittämään elastisuusmittausten avulla. Tavoitteena on nähdä, kuinka paljon viruspartikkeli painuu sitä painettaessa ja hajoaako se jossain vaiheessa. Tekniikan kehityksen kannalta tarkoituksena on saada cpv-partikkeleiden kuvantaminen onnistumaan sekä kuiva- että nesteympäristössä. Myös elastisuusmittausten suorittaminen on uusi tekniikka, jonka käyttöönotto vaatii kehitystyötä.

## 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Mittaukset suoritettiin Dimension 3100 atomivoimamikroskoopilla ja Nanoscope IV kontrolliyksiköllä. Viruksena toimi CPV tyyppi 2 (CPV-d) viruskanta (lahja Colin Parrishilta, Cornell University, Ithaca, New York). Viruspartikkeleiden puhdistuksesta huolehti laboratoriomestari Pirjo Kauppinen, viruspreparaattien proteiinikonsentraatio vaihteli välillä 0,2 - 0,4 mg/ml.

### 3.1 Näytteiden valmistus

Kaikissa kuvauksissa näytepintana käytettiin mineraalikiillettä.

#### 3.1.1 Kuivassa ympäristössä kuvannetut näytteet

Lähes kaikki kuivan ympäristön näytteet valmistettiin samalla menetelmällä. Näytepinnalle pipetoitiin 5 µl virusnäytettä ja inkuboitiin 10 minuuttia kosteassa kammiossa. Riippuen kulloinkin käytössä olevasta preparaatista käytettiin joko virusliuosta tai sen laimennusta. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin näytteen pesu: Pipetoitiin 40 µl PBS- liuosta virusliuoksen päälle ja poistettiin se heti. Näyte kuivattiin typpikaasulla. Sama toistettiin käyttäen 40 µl vettä. Molemmissa vaiheissa typpikaasulla kuivaus pyrittiin tekemään mahdollisimman nopeasti, sitä jatkettiin vain siihen asti, että neste oli silmämääräisesti haihtunut.

Kuivassa ympäristössä kuvannettiin myös näytekäsittelyllä, joka tuotti nesteympäristössä parhaimman lopputuloksen. Näytepinta päällystettiin inkuboimalla 40 µl poly-L-lysiiniä (PLL) (10 mg/ml) kolme minuuttia, jonka jälkeen pinta pestiin PBS:llä. Virusliuos lisättiin seuraavaksi, sitä inkuboitiin kosteassa kammiossa 10 minuuttia. PBS:llä huuhtelun jälkeen viruspartikkelit fiksoitiin 40 µl:lla glutaraldehydiä (0,1%). Puolen tunnin inkuboinnin jälkeen näyte pestiin ensin PBS:llä ja sen jälkeen vedellä. Viimeiseksi näyte kuivattiin typpikaasulla.

#### 3.1.2 Nesteympäristössä kuvannetut näytteet

Nesteympäristössä kuvannettujen näytteiden valmistus oli monimutkaisempaa. Aiemmin tehdyissä kokeilevissa mittauksissa oli todettu, ettei virus tartu paljaalle mineraalikiilteelle

tarpeeksi lujaa nesteympäristössä kuvaamista varten, joten liikkeelle lähdettiin suoraan poly-L-lysiinillä päällystetyistä näytepinnoista. Päällystys tehtiin inkuboimalla näytepintaa 40 µl:lla poly-l-lysiiniä (10 mg/ml) kolme minuuttia ja pesemällä PBS:llä. Jatkokäsittelyjä tehtiin usealla eri tavalla.

Pelkistetyin käsittely sisälsi virusliuoksen 10 minuutin inkuboinnin kosteassa kammiossa PLL-pinnan päällä. Tämän jälkeen ylimääräinen virusliuos pipetoitiin pois ja näyte pestiin varovasti 40 µl:lla PBS:ää. Viimeiseksi näytteen päälle lisättiin pisara PBS:ää kuvantamista varten. Vastaavaa käsittelyä kehitettiin lisäämällä virusinkuboinnin jälkeen 50 µl paraformaldehydiä (PFA) (0,5 %) ja inkuboimalla 30 minuuttia. Lopuksi näyte pestiin PBS:llä.

Vaihtoehtoisesti PLL-pinta fiksoitiin ensin 1 mM bis(sulfosukkimidyyli)suberaatilla (BS3). 80 µl BS3:a inkuboitiin 5 minuuttia, jonka jälkeen pestiin PBS:llä ja inkuboitiin 5 µl virusliuosta 15 minuuttia kosteassa kammiossa. Ylimääräinen virusliuos pipetoitiin pois ja pinnalle laitettiin PBS pisara.

Viimeinen käsittely oli glutaraldehydillä (GA). PLL-pintaa inkuboitiin virusliuoksella kosteassa kammiossa 10 minuuttia. Virusliuoksen määrä vaihteli 5-10 µl välillä viruspreparaatista riippuen. Liuos poistettiin pipetoimalla, jonka jälkeen näyte fiksoitiin 40 µl:lla glutaraldehydiä (0,1 %), jota inkuboitiin 30 minuuttia. Näyte pestiin runsaalla määrällä PBS:ää.

PBS toimii kuvantamispuskurina kaikissa nesteympäristössä tehdyissä kuvauksissa. Näytteen pinnalla pidettiin PBS pisaraa aina myös näytteen valmistuksen ja kuvantamisen välisenä aikana.

## **3.2 Suoritetut mittaukset**

### **3.2.1 AFM kuvantaminen kuivassa ympäristössä**

Suurimmassa osassa kuivassa ympäristössä tehdystä peruskuvantamisesta tehtiin CPV:n tyhjille kapsideille, mutta kuvannettiin myös täysiä kapsideja. Kärkinä toimivat BS (Budget sensors) – Multi 75 kärjet, joiden jousivakio on 3 N/m ja resonanssitaajuus 75 kHz. Otettujen kuvien koko vaihteli välillä 5-0,5 µm. Kuvaustarkkuus määriteltiin



samples/line toiminnolla ja kuvan koosta riippuen sen arvo, eli kuvan pikselimäärä, vaihteli välillä 512-1024. Kuvantamisnopeutena (scan rate) käytettiin yleensä 1 Hz, eli viivaa sekunnissa, yksittäisissä kuvissa myös arvoja 1,5 Hz ja 2 Hz. Amplitudin kynnyksarvon (amplitude setpoint) asetuksella minimoitiin käytettävä voima. Arvoa kasvatettiin ensin niin kauan, että kärki poistui kontaktista. Tämän jälkeen kynnyksarvoa pienennettiin hitaasti, kunnes kuva oli toivotun laatuinen. Viimeinen säätö suoritettiin integraalisen ja suhteellisen vahvistuksen (integral gain ja proportional gain) asetuksilla. Arvot asetettiin mahdollisimman suuriksi, kuitenkin niin, että kuvan laatu oli hyvä. Integraalisen vahvistuksen arvo vaihteli kuvauksissa välillä 0,2-0,4 ja suhteellisen vahvistuksen välillä 0,6-4. Eri kanavat säädettiin kuvaamaan korkeus (height), amplitudi (amplitude) sekä vaihe (phase) muodoissa.

### **3.2.2 AFM kuvantaminen nesteympäristössä**

Nesteympäristössä kärkinä käytettiin DNP-S20 kärkiä jousivakioilla 0,32 ja 0,12 sekä vastaavasti kuivassa mitatuilla resonanssitaajuuksilla 40-75 kHz ja 14-26 kHz. Resonanssitaajuuden etsintä suoritettiin manuaalisesti ja valittiin resonanssiipiikki alueilta 7-9 kHz tai 11-12 kHz tapauskohtaisesti. Nesteympäristön vuoksi kuvauksessa käytetty resonanssitaajuus erosi kärjille määrätystä. Näytteen pinta etsittiin aluksi kontaktimoodissa ja sen sijainti z-suunnassa merkittiin ylös. Tekniikaksi vaihdettiin tapping-moodi ja manuaalisesti laskettiin kärki n. 100  $\mu\text{m}$  päähän pinnasta, josta lopullinen lähestyminen aloitettiin. Resonanssitaajuuden etsintä toistettiin vielä pinnan löytymisen jälkeen sen läheisyydessä ja aloitettiin varsinainen kuvantaminen. Käytetty voima optimoitiin amplitudin kynnyksarvoa muuttamalla kuivakuvantamisen tapaan. Kuvakoot vaihtelivat välillä 0,5-5  $\mu\text{m}$  ja vastaavasti samples/line asetus välillä 512-1024 pikseliä. Kuvantamisnopeus säädettiin olosuhteista riippuen välille 1-3 Hz. Integraalinen vahvistus sai arvoja väliltä 0,1-0,5 ja suhteellinen vahvistus väliltä 1-4.

### **3.2.3 Elastisuusmittaukset**

Painelumittaukset suoritettiin kuivassa ympäristössä. Ennen kuvantamisen aloittamista normaaliasetusten lisäksi kytkettiin palkin x- ja y-koordinaattien takaisinkytkentä (closed loop) toiminto päälle. Ensimmäiseksi kuvan laatu säädettiin hyväksi kuivakuvauksessa käytetyin metodein, ainoana poikkeuksena samples/line toiminto jätettiin arvoon 256

mittausten nopeuttamiseksi. Näytteestä etsittiin paljasta näytepintaa ja sen kohdalla säädettiin paineluasetukset halutunlaisiksi Ramp- toiminnolla. Painelun aloituskorkeutena (ramp size) oli 100 nm, muutamissa kokeiluvaiheen mittauksissa käytettiin myös arvoja 50 nm ja 200 nm. ”Update sensitivity”- toiminnolla muutettiin palkin taipuman maksimiarvon (trigger treshold) mittayksikkö volteista nanometreihin. Trigger modena käytettiin suhteellinen toimintoa. Eri kanavat säädettiin keräämään dataa kärjen taipuman (TM Deflection), amplitudin (amplitude) ja vaiheen (phase) muodoissa. Kuvan koko puolitettiin vaihtamalla aspect ratio- arvoon asetus 2.

Painelut aloitettiin etsimällä näytteestä yksittäisiä viruspartikkeleita. Mittauksissa käytettiin ”point ja shoot”- toimintoa. Samaa partikkeliä paineltiin aina kasvavalla palkin taipuman maksimiarvolla, käytettiin arvoja 10, 20, 35 ja 50 nm. Painelut tehtiin viiva (line) asetuksella, jossa näytettä painellaan piirretyn viivan suuntaisesti halutulla määrällä painelupisteitä. Mittausviivan pituus vaihteli välillä 90-130 nm ja pisteiden välinen matka välillä 6-8 nm. Viiva piirrettiin aina tavalla, jossa viruspartikkeli osui viivan keskelle. Molempiin reunoihin jäi näin ollen paljasta näytepintaa.

### **3.2.4 Elastisuusmittaukset vaihtelevalla amplitudilla**

Palkin maksimitaipuman ohella toinen tapa suorittaa paineluita oli vapaata amplitudia muuttamalla. Kärjen resonanssitaajuuden etsimisen aikana kirjattiin ylös laskettu Q-arvo käytetylle kärjelle sekä valittu värähtelytaajuus. Jotta amplitudin yksikkö voitiin muuttaa tulosten analysoinnin aikana volteista nanometreihin, otettiin 0 nm kokoinen kuva, jossa amplitudin kynnyсарvoa laskettiin 0,1 V keskellä kuvaa. Kuva tallennettiin ”offline planefit”- asetuksen ollessa ”offset”- tilassa. Amplitudin volttimäärän muutosta vastaavasta korkeuden muutoksesta saatiin määritettyä suhde voltti- ja nanometri-yksiköiden välille.

Ramp- asetukset olivat muuten samat kuin taipumapaineluissa, ainoastaan palkin taipuman maksimiarvo pidettiin koko ajan vakiona arvossa 10 nm.

Mittauksia ennen säädettiin RMS amplitudin arvoksi n. 1 V palkkiin lähetetyn värähtelyn asetusta (drive amplitude) muuttamalla. Käytännössä painelut tapahtuivat kasvattamalla drive amplitude- arvoa tietyn määrän ja säätämällä tämän jälkeen amplitudin kynnyсарvolla

kuvausvoima mahdollisimman pieneksi. Paineluja suoritettiin viidellä eri vapaan amplitudin arvolla.

### **3.3 Tulosten analysointi**

#### **3.3.1 Viruspartikkeleiden korkeuden muuttuminen**

Partikkeleiden profiileja ja korkeuksia tutkittiin Nanoscope v6.13r1- ohjelman ”section” työkalulla. Korkeus määritettiin etsimällä vaakatasoon piirretylle partikkeliprofiilille paikka, jossa korkeusero viruksen ja näytepinnan välillä oli mahdollisimman suuri. Selkeät kuvauksesta johtuvat erot jätettiin kuitenkin huomiotta. Korkeus laskettiin kuvasta, joka tallentuu paineluiden yhteydessä ja kuvaa tilannetta ennen mittausta. Painelun jälkeinen korkeus saatiin seuraavan mittauksen vastaavasta kuvasta. Tästä johtuen viimeisen painelun jälkeinen korkeus saatiin määritettyä vain niissä tapauksissa, joissa paineltu virus näkyi samassa kuvassa seuraavan viruksen kanssa.

Korkeudet taulukoitiin ja niistä laskettiin korkeuden muutos verrattuna alkuperäiseen korkeuteen, jossa virusta ei vielä ollut paineltu kertaakaan. Virukset jakautuivat korkeuksiltaan selvästi kahteen eri ryhmään, selvästi yli ja alle 20 nm korkeisiin. Nämä ryhmät päätettiin käsitellä erikseen ja niiden korkeuden muutoksista laskettiin keskiarvot sekä keskihajonnat.

#### **3.3.2 Sisäänpainuminen mittauksen aikana**

Paineluiden osumisen tarkkuutta selvitettiin sekä vaihekuvaajan selvästi havaittavien muutosten että taipumakuvaajasta määritetyn kulmakertoimen avulla. Taipumakuvaajan lopusta lasketusta kulmakertoimesta saatiin jokaiselle mittaukselle oma profiilinsa, josta osaltaan pääteltiin virukseen sekä näytepintaan osuneet painelupisteet.

Jokaisesta tehdystä mittauksesta valittiin yksi piste, jonka kohdalla havaittu vaikutus oli suurin. Yleensä tämä piste oli ensimmäinen, jossa kärki kokonaan osui viruksen päälle. Pisteestä taipuma-kuvaajasta katsottiin kohta, jossa palkin taipuminen alkoi. Tässä kohdassa nollattiin sekä taipuman että z-pietson liikkeen arvot, jolloin saatiin uusi taipumakuvaaja oletetusta taipumisen aloituskohdasta lähtien. Pisteparin taipuman arvo vähennettiin aina vastaavasta z-pietson liikkeen arvosta, saatiin siis ero todelliselle taipumiselle verrattuna

teoreettiseen oletukseen kovalla alustalla. Toisin sanoen pinnan periksi antaminen z-pietson liikkeen funktiona. Vastaavat laskut tehtiin myös näytepintaan osuneille pisteille, jotka otettiin useasta eri paineluista.

Tuloksia käsiteltiin kolmessa eri ryhmässä, alle 20 nm korkeat partikkelit, yli 20 nm korkeat partikkelit sekä vertailuna näytepintaan osuneiden paineluiden ryhmä. Omissa ryhmissään toisiaan vastaavat arvot keskiarvoistettiin kuvaajiksi, joihin laskettiin lisäksi keskihajonnat.

### 3.3.3 Energian siirtymisen teho

Energian siirtymisen tehoa kärjestä näytteeseen laskettiin kaavalla 2 (Anczykowski, B. ym., 1999/2). Kaavassa  $k$  on kärjen jousivakio,  $Q_{cant}$  kärjen Q-arvo,  $\varphi$  vaihe ja  $A$  amplitudi.  $A_0$  puolestaan kuvaa vapaata amplitudia. Värähtelytaajuus  $\omega$  laskettiin kärjen taajuudesta  $f$  kaavalla  $\omega = 2\pi f$ .

$$\bar{P}_{tip} = \frac{1}{2} \frac{k\omega}{Q_{cant}} \left[ A_0 A \sin \varphi - A^2 \right] \quad [2]$$

Amplitudi- kuvaajan yksikön muuntokerroin laskettiin mittausten alussa otetusta kuvasta sijoittamalla amplitude setpoint- arvon muutos ( $\Delta A$ ) sekä muutoskohdassa tapahtunut korkeuden muutos ( $\Delta Z$ ) muuntokertoimen kaavaan 3:

$$\text{muuntokerroin} = 2(\Delta Z) / (\Delta A) \quad [3]$$

Vaihe- kuvaajan yksikkö muutettiin asteista radiaaneiksi ja sen alkutaso siirrettiin nolnaan. Vapaa amplitudi saatiin amplitudi-kuvaajan alkupäästä laskemalla keskiarvo ensimmäisistä arvoista. Kärjen jousivakio oli ilmoitettu ja Q-arvo saatiin laskettua kärjen resonanssitaajuuden määrittämisen aikana. Arvot sijoitettiin kaavaan 2 ja laskettiin energian siirtymisen teho. Viimeiseksi tehon yksiköksi muutettiin pW.

Jokaisesta painelusta valittiin kaksi pistettä, ensimmäinen oli parhaiten viruspartikkeliin osunut sekä toinen näytepinnan päältä. Näille pisteille laskettiin kaavan 2 mukainen teho. Viimeiseksi muutettiin kuvaajien alkutaso nollaenergiaan. Virusten päälle osuneiden paineluiden tehokuvaajat keskiarvoistettiin ja niistä piirrettiin kuvaaja mitatuilla kahdella eri vapaalla amplitudilla. Toinen kuvaaja tehtiin vähentämällä jokaisesta virus-kuvaajasta

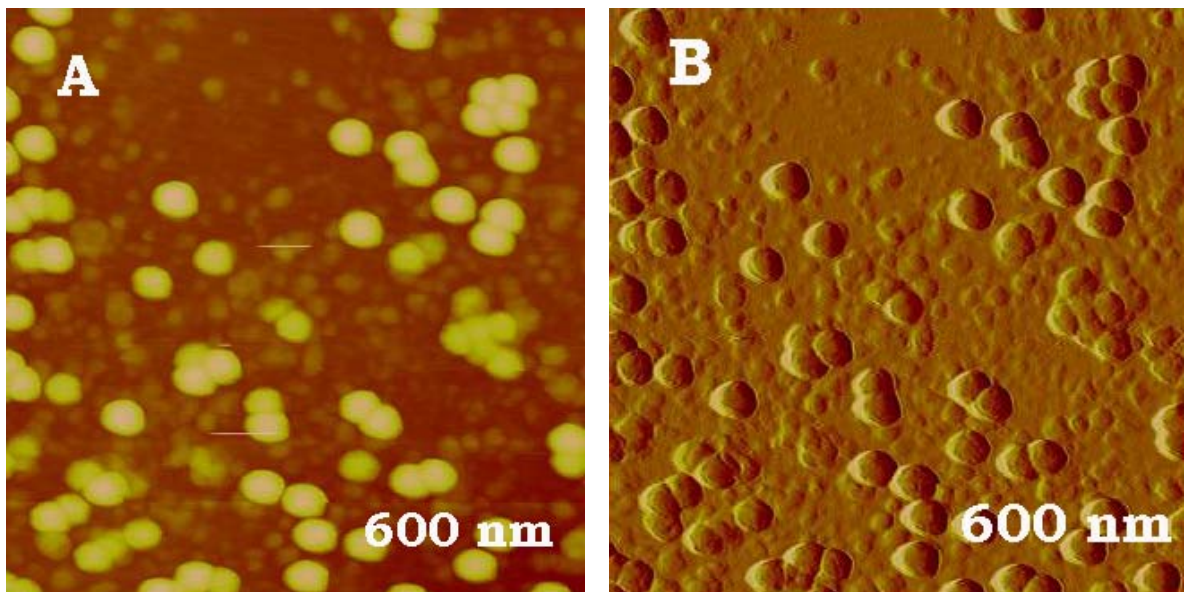
erikseen saman mittauksen vastaava näytepintaan osunut kuvaaja. Saadut erotuskuvaajat keskiarvoistettiin ja näin saatiin kuvaaja energian siirtymisen tehosta viruksen päällä erotuksena näytepintaan. Laskettiin myös keskihajonnat.

## 4 TULOKSET

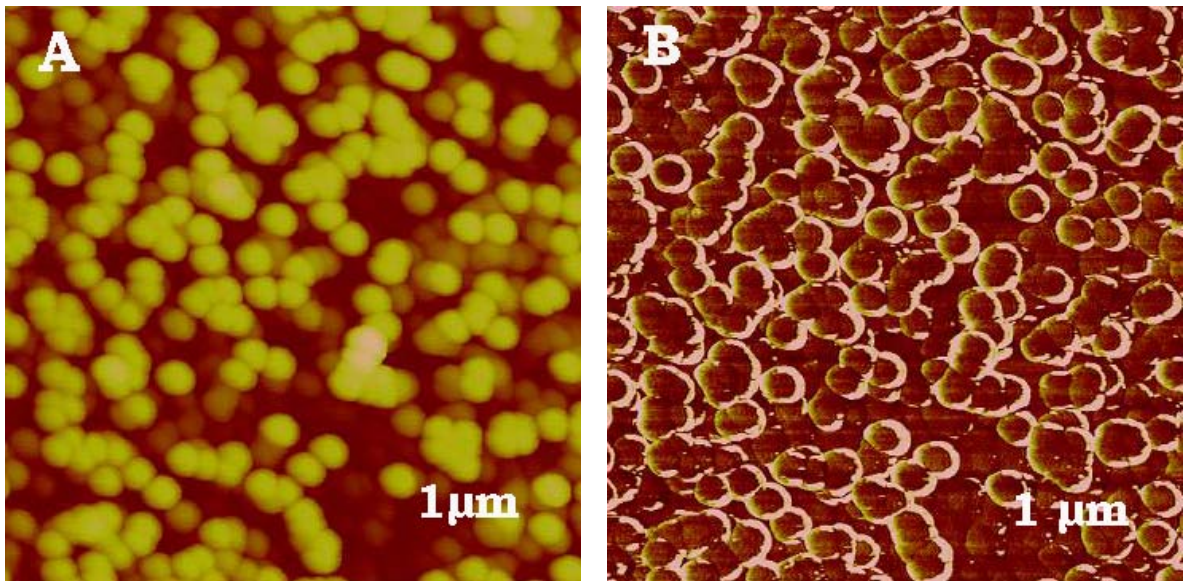
### 4.1 Peruskuvantaminen

Tyhjiä ja täysisiä viruskapsideja kuvannettiin kuivassa ympäristössä. Näytteet valmistettiin inkuboimalla virusliuosta näytepinnalla ja pesemällä hellävaraisesti. Kuvassa 4 näkyy tyhjiä ja kuvassa 5 täysisiä viruskapsideja. Eri kapsidien välillä ei näy havaittavaa eroa.

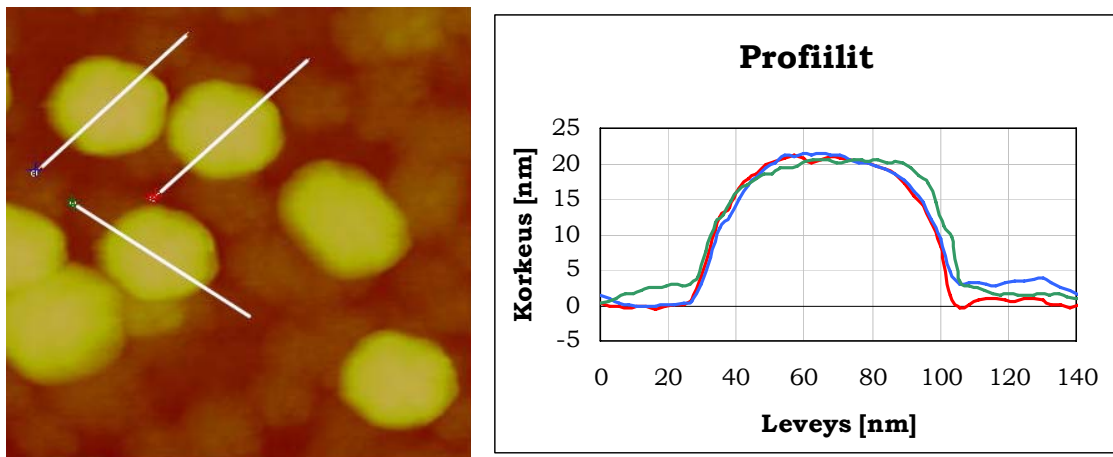
Kuvassa 6 on suurennos täysistä kapsideista ja kolmen eri partikkelin profiilit on havainnollistettu kuvan mukaisesti. Profiileista voi huomata partikkeleiden samankaltaisuuden, kaikkien korkeus on myös n. 20 nm. Leveydeltään partikkelit ovat kuvan mukaan hieman alle 80 nm, partikkelien todellinen halkaisija on n. 26 nm (Tsao, J. ym., 1991).



Kuva 4: Tyhjiä viruskapsideja kuivassa ympäristössä. 600x600 nm kokoiset a) korkeus- ja b) amplitudi-kuva.



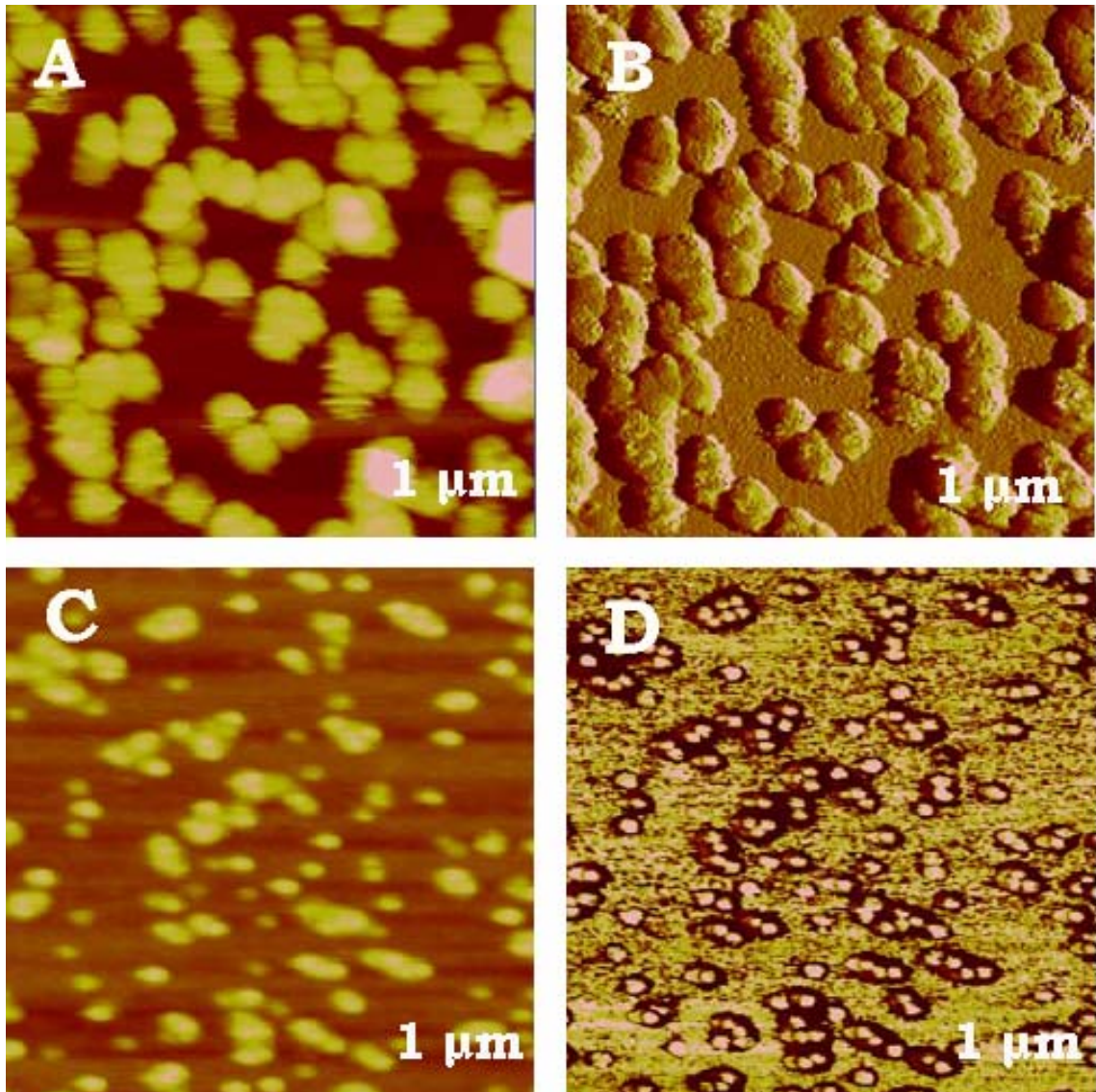
Kuva 5: Täysiä viruskapsideja kuivassa ympäristössä. 1x1 μm kokoiset a) korkeus- ja b) vaihe-kuva.



Kuva 6: 300x300 nm kokoinen suurennus täysien viruskapsidien korkeus-kuvasta kuivassa ympäristössä sekä yksittäisten viruspartikkeleiden profiilit.

Nestekuvauksen tavoitteena oli löytää tapa kiinnittää viruspartikkeli myös nesteessä kuvauspintaan kiinni tarpeeksi lujasti ja näin ollen mahdollistaa sen kuvantaminen. Ensimmäiset näytekokeilut eivät onnistuneet, pinnoilla näkyi ainoastaan selvästi viruspartikkeleja pienempiä rakenteita. Glutaraldehydillä käsitelty pinta oli kokeilluista ainoa, jossa erottui selvästi oikeaa kokoluokkaa olevia partikkeleja. Ongelmana oli kuitenkin kärjen nopea likaantuminen, yleensä vain lyhytaikaisen onnistuneen kuvantamisen jälkeen kuvassa näkyi kärjen aiheuttamaa epäsymmetrisyyttä. Vertailun vuoksi vastaava näyte kuvannettiin myös kuivassa ympäristössä. Kuvassa 7 on kuvia PLL- ja GA- käsitellyistä näytteistä sekä neste- että kuivaympäristössä. Näytteet on valmistettu inkuboimalla virusluosta PLL-pinnoitetulla näytepinnalla ja tämän jälkeen fiksoimalla GA:lla. Kuivissa olosuhteissa kuvannettu näyte pestiin kerran vedellä ja kuivattiin tippikaasulla. Nestekuvissa voi havaita paljon huonomman kuvaustarkkuuden ja viruspartikkeleiden epäsymmetrisyyden verrattuna kuivakuvaukseen. Kuivan ympäristön kuvissa viruspartikkeleiden koko on paljon lähempänä oikeaa ja varsinkin vaihe-kuvassa yksittäiset viruspartikkelit erottuvat hyvin selkeästi.



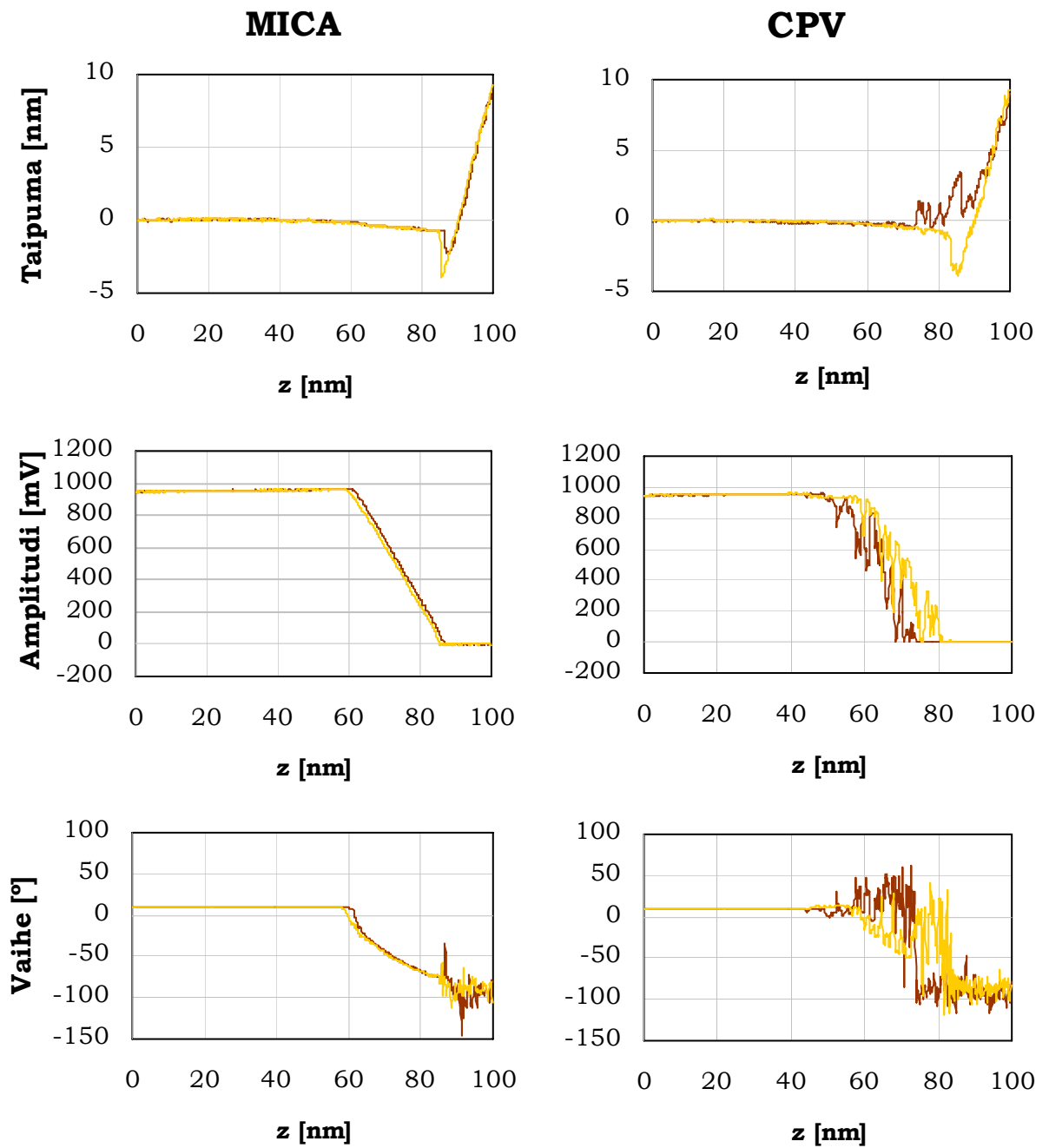


Kuva 7: PLL ja GA käsiteltyjen näytteiden 1x1 μm kuvia. Nesteympäristössä kuvattu näyte a) korkeus- ja b) amplitudi-kuvana. Kuivassa ympäristössä kuvattu näyte c) korkeus- ja d) vaihe-kuvana. Näytteiden valmistus oli samankaltainen, ainoana erona kuivassa ympäristössä kuvattu näyte pestiin kertaalleen vedellä ja kuivattiin typpikaasulla.

## 4.2 Elastisuusmittauksen periaate

Kuvassa 8 olevista eri kuvauskanavista saaduista signaaleista voi seurata painelumittauksen etenemistä. Ko. mittaus on suoritettu taipuman kynnysarvolla 10 nm ja taipuman maksimiarvolla 100 nm. Taipuma-kuvaajassa palkin taipuminen alkaa kohdasta, jossa kärki tulee kontaktiin pinnan kanssa. Tämän jälkeen taipuma kasvaa, kunnes se saavuttaa määrätyn maksimiarvon, jossa alas suuntautuva liike loppuu. Loittonemiskuvaaja alkaa tästä kohdasta ja kuvaa palkin taipumaa poisvetäytymisen aikana. Amplitudi-kuvaajan kiinnostavin kohta on ennen kärjen ja pinnan lopullista kontaktia. Kärki värähtelee aluksi vapaana vakioamplitudilla. Jossain vaiheessa kärki alkaa tuntea pinnan läheisyyden ja värähtelyn amplitudi pienenee lineaarisesti z-pietson liikkeen funktiona. Kohdassa, jossa kontakti viimein syntyy, ei kärki enää värähtelee ja näin ollen amplitudi saa arvon nolla. Vaihe-kuvaajan muutokset alkavat samalla korkeudella kuin muutokset amplitudi-kuvaajassa. Kärjen värähdellessä vapaasti vaihe-ero on vakio. Kun kärki alkaa tuntea pinnan läheisyyden, vaihe-ero muuttuu säännöllisesti, kunnes vakiintuu uudelleen tiettyyn arvoon kärjen ja pinnan kontaktin syntyessä.

Kuvaajista näkee selvästi eron virukseen ja näytepintaan osuneiden paineluiden välillä. Näytepinnan kohdalla jokainen eri kanavan kuvaajista on selkeä, eikä lähestymis- ja loittonemiskuvaajien välillä ole huomattavaa eroa. Vastaavissa kuvaajissa viruspartikkeliin osuneesta mittauksesta voidaan nähdä lähestymis- ja loittonemiskäyrien erilaisuus. Lisäksi kuvaajien arvot vaihtelevat suuresti, eivätkä etene lineaarisesti.



Kuva 8: Painelumittauksen tuloksena saatavat kuvaajat sekä näytepintaan että viruspartikkeliin osuneen painelun kohdalta. Ruskea viiva kuvaa kärjen lähenemistä ja keltainen loittonemista painelun jälkeen.

### 4.3 Viruspartikkeleiden elastisuusmittaukset

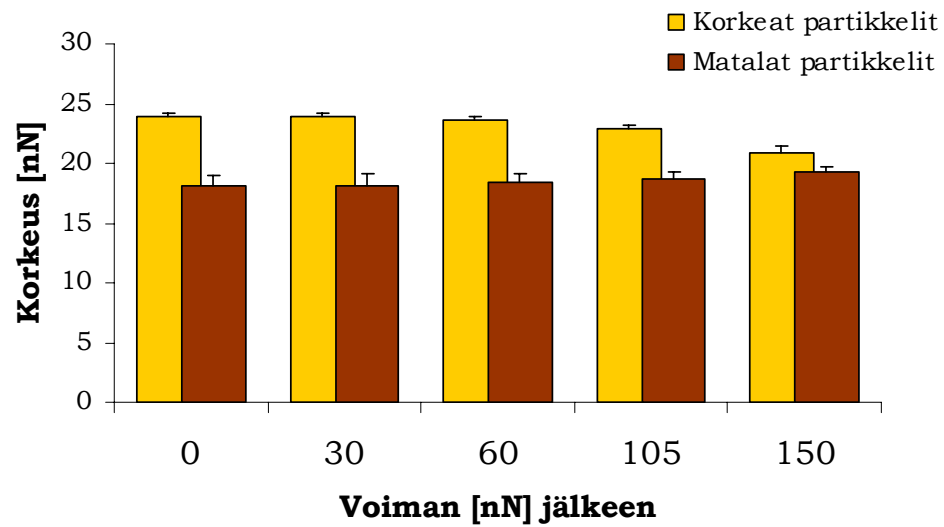
Painellut viruspartikkelit jakautuvat korkeutensa puolesta selkeästi kahteen eri ryhmään, yli ja alle 20 nm korkeisiin. Tulokset käsiteltiin ja keskiarvoistettiin erikseen näissä ryhmissä. Viruspartikkeleiden korkeudet vaihtelivat välillä 16–25 nm.

#### 4.3.1 Partikkeleiden korkeuden muuttuminen

Partikkeleiden korkeudet mitattiin ennen ja jälkeen paineluiden otetuista kuvista. Koska kaikista partikkeleista ei ollut saatavilla viimeisen painelun jälkeistä kuvaa, ei niille voitu tätä korkeutta laskea. Korkeiden partikkeleiden (n=6) viimeisen voiman jälkeiselle korkeudelle n=5. Vastaavasti matalampien partikkeleiden (n=4) viimeisen voiman jälkeinen n=2. Koska matalampien partikkelien määrä on vähäinen, varsinkin viimeisen voiman jälkeen, ovat tulokset niiden osalta vain viitteellisiä. Erot korkeisiin partikkeleihin ovat kuitenkin huomattavia, joten tulosten käsittely erikseen on perusteltua.

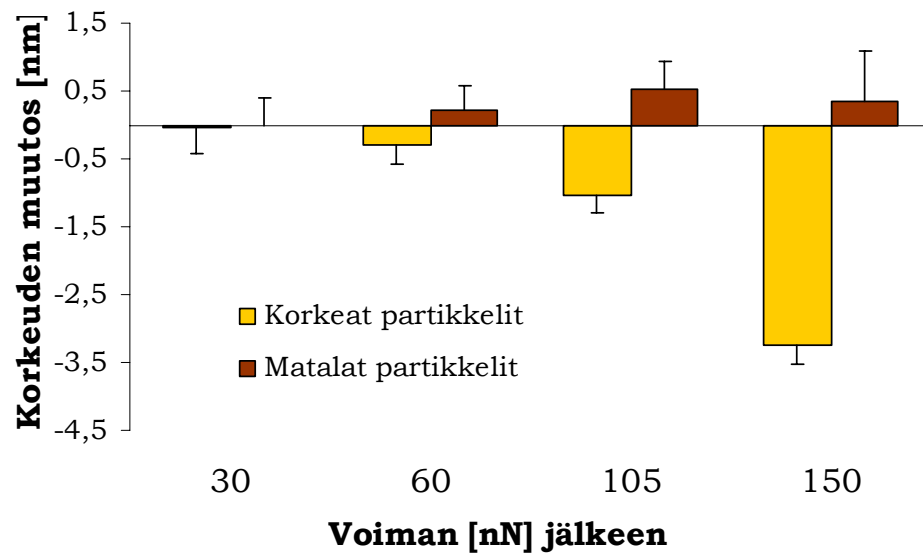
Korkeuksien keskiarvot ja keskihajonnat näkyvät kuvassa 9. Huomattavaa on korkeiden ja matalien partikkeleiden korkeuden läheneminen paineluiden tuloksena. Korkeuksien muutoksia selvitettiin tarkemmin vertaamalla partikkelin paineluiden välisiä korkeuksia partikkelin alkukorkeuteen. Korkeuksien muutosten keskiarvot ja -hajonnat näkyvät kuvassa 10. Kuvaajasta huomaa selvästi eron korkeiden ja matalien partikkeleiden käyttäytymisen välillä. Korkeiden partikkeleiden korkeus laskee säännöllisesti, kun taas matalilla korkeus vaihtelee epäsäännöllisesti. Huomattavaa on myös matalilla partikkeleilla oleva paljon suurempi hajonta, jota voi osaltaan selittää myös mittausten alhaisempi määrä.

## Partikkeleiden korkeudet



Kuva 9: Viruspartikkeleiden korkeudet painelun eri vaiheissa. Ensimmäisistä palkeista näkyy selvästi viruspartikkeleiden jakautuminen kahteen eri ryhmään korkeuden mukaan.

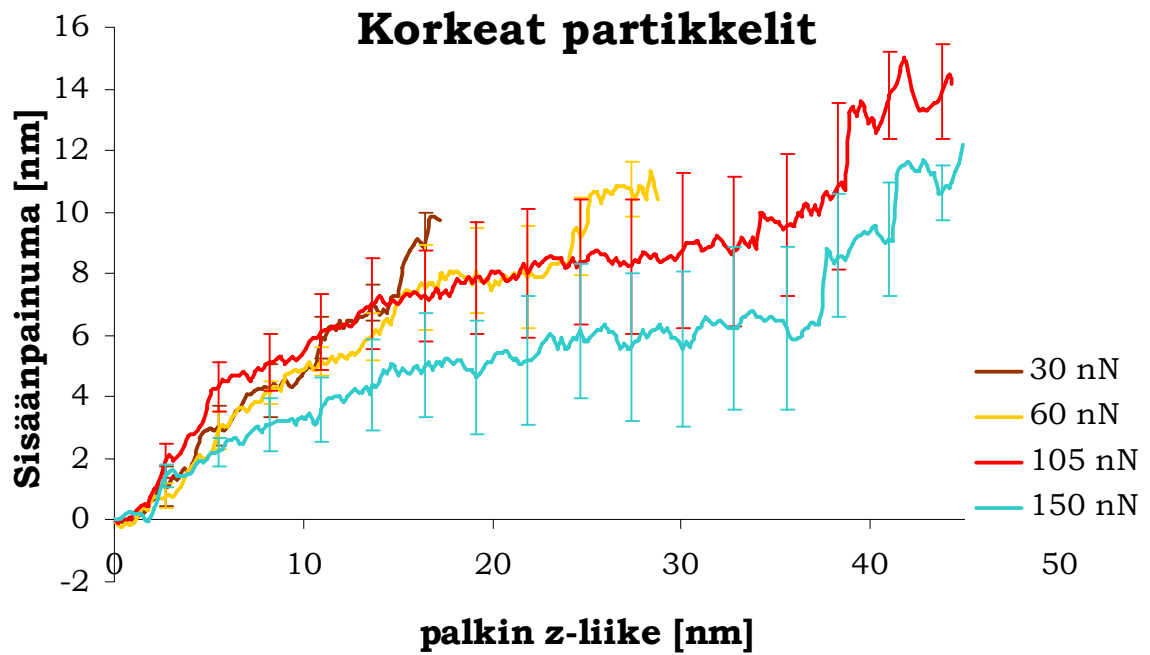
## Korkeuden muutos



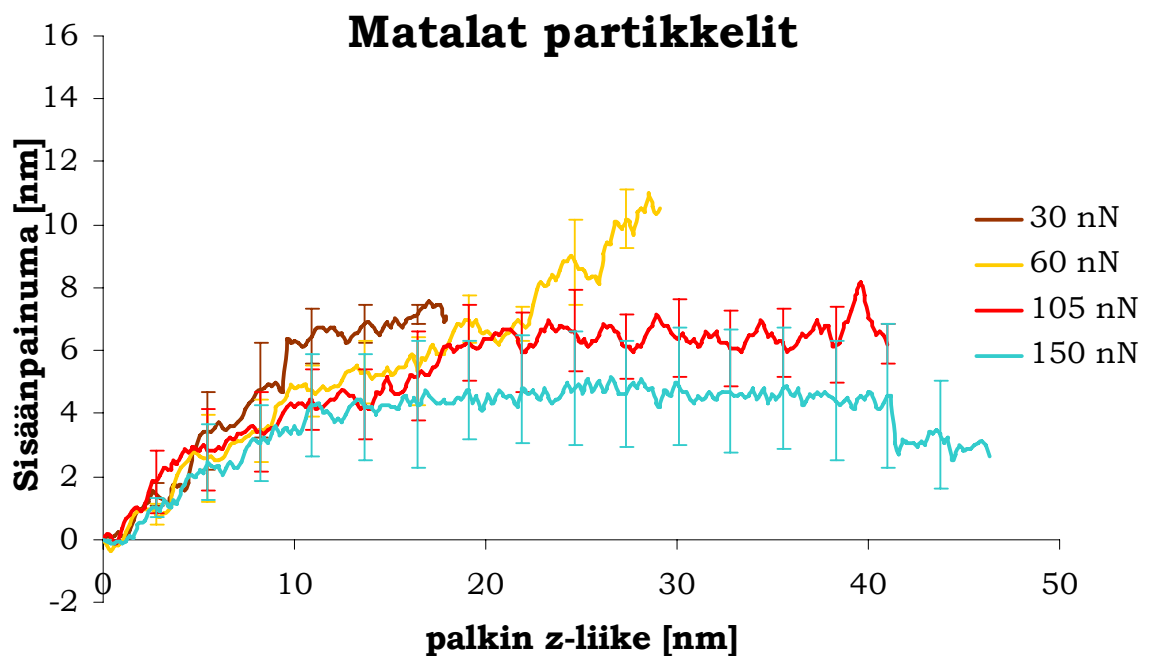
Kuva 10: Viruspartikkeleiden korkeuden muuttuminen verrattuna partikkelin alkuperäiseen korkeuteen.

### 4.3.2 Korkeuden muuttuminen painamisen aikana

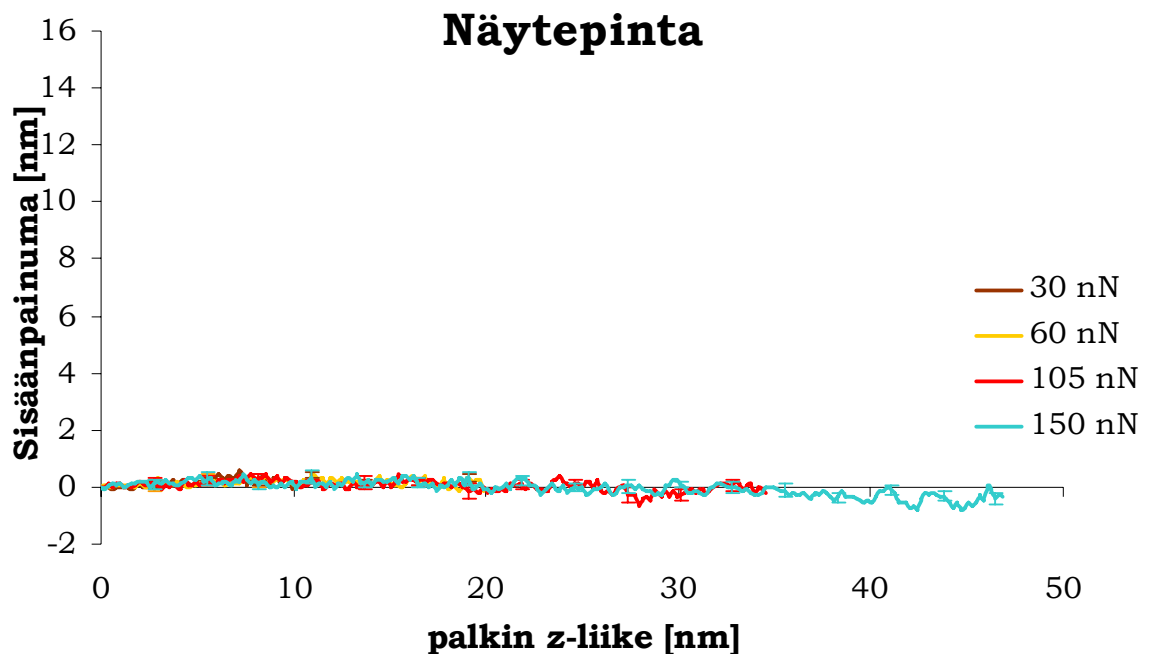
Pinnan elastisuutta havainnollistettiin kuvissa 11-13 näkyvillä kuvaajilla, joissa z-liikkeen funktiona esitettiin painumisen suuruus erotuksena ideaaliin kovaan alustaan. Kuvaajista näkee siis pinnan sisään painumisen mittauksen eri kohdissa. Matalat ja korkeat partikkelit keskiarvoistettiin omiksi kuvaajikseen, joissa kuvan 11 korkeiden partikkeleiden  $n=6$  ja kuvan 12 matalien partikkeleiden  $n=4$ . Lisäksi tehtiin kuvassa 13 oleva vastaava kuvaaja näytepintaan osuneista paineluista, jossa  $n=5$ . Kuvaajista huomataan selvä ero viruspartikkeleihin ja näytepintaan osuneiden paineluiden välillä. Näytepinnan kuvaaja kulkee koko ajan lähellä nollaa, eli kärki ei aiheuta painumaa. Korkeiden partikkeleiden kohdalla painuminen on jokaisella voimalla vähintään 10 nm, suurimmilla voimilla painumista tapahtuu jopa 15 nm asti. Matalat partikkelit painuvat vastaavasti vain 3-7 nm, korkeimmillaan taipuminen on n. 11 nm 60 nN voimalla. Lisäksi huomattava ero korkeiden ja matalien partikkeleiden välillä on korkeiden partikkelien painuminen loppua kohden kasvavasti. Vastaavassa kohdassa seuraavalla pidemmällä taipumalla tehdyssä painelussa nousua ei enää havaita. Matalien partikkeleiden kohdalla sisään painuminen pysähtyy tiettyyn arvoon, jonka jälkeen partikkelit eivät enää anna periksi. Yksittäisissä kuvaajissa ennen keskiarvostusta yhteisenä piirteenä olivat usein jyrkät korkeuden muutokset eli romahdukset, erityisesti paineluiden alkupäissä. Eriaikaisuutensa vuoksi ilmiö ei näy keskiarvostetuissa kuvaajissa yhtä selkeänä.



Kuva 11: Korkeiden viruspartikkeleiden elastisuus painamisen z-liikkeen funktiona, laskettu erotuksena ideaaliin kovaan pintaan. Kärjen kontakti partikkeliin, kun  $z=0$ .



Kuva 12: Matalien viruspartikkeleiden elastisuus painamisen z-liikkeen funktiona, laskettu erotuksena ideaaliin kovaan pintaan. Kärjen kontakti partikkeliin, kun  $z=0$ .



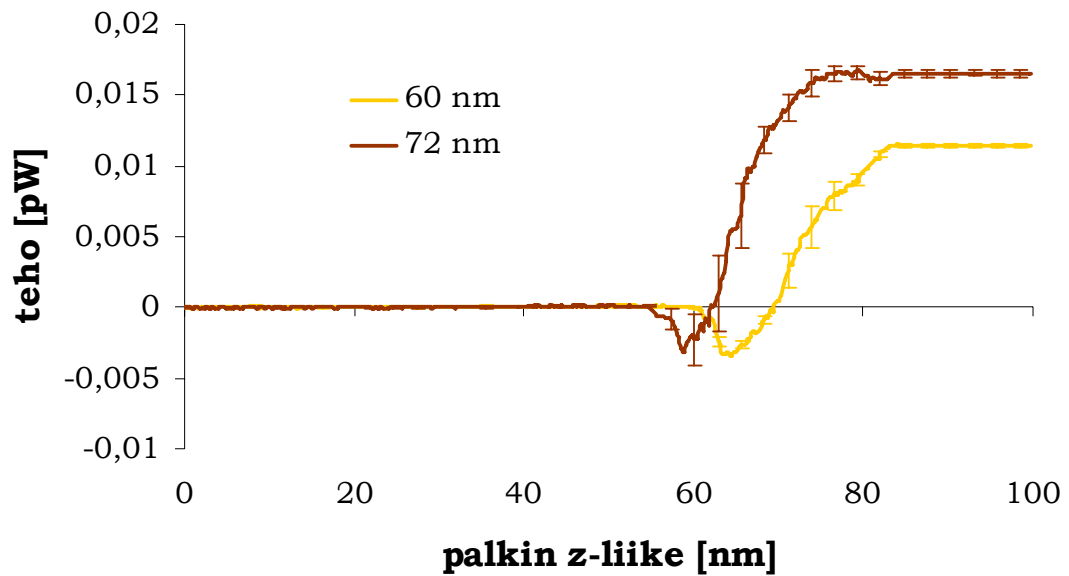
Kuva 13: Näytepinnan elastisuus painamisen z-liikkeen funktiona, laskettu erotuksena ideaaliin kovaan pintaan. Kärjen kontakti pintaan, kun  $z=0$ .

### 4.3.3 Energian siirtyminen kärjestä pintaan

Painelumittauksia tehtiin viiden eri vapaan amplitudin arvolla. Amplitudisteikon skaalauksen vuoksi kuitenkin ainoastaan kaksi matalinta vapaan amplitudin arvoa jäivät asetetun asteikon sisään. Tämän vuoksi energian siirtymistä kärjestä pintaan voitiin laskea vain kahdella eri vapaan amplitudin arvolla. Energian siirtyminen esitettiin palkin z-liikkeen funktiona kuvassa 14. Molemmilla arvoilla  $n=5$ . Vapaa amplitudi määrää lopullisen tason, jolle teho jää kärjen ja pinnan kontaktin syntyessä. Alussa energian siirtyminen on nolla, kunnes jossain vaiheessa energiaa alkaa siirtyä pinnasta kärkeen. Nopeasti suunta muuttuu ja teho kasvaa, kunnes täydessä kontaktissa energiaa siirtyy vakioteholla kärjestä pintaan. Kuten odottaa saattaa, korkeammalla vapaalla amplitudilla energian siirtyminen alkaa aikaisemmassa vaiheessa kuin matalammalla. Kuvan 15 kuvaajassa tehosta on vähennetty vastaavan mittauksen näytepintaan osuneen painelun teho. Kuvaajasta nähdään siis pehmeämmän pinnan vaikutus energian siirtymiseen. Selvästi havaitaan korkeammalla vapaalla amplitudilla eron näytepinnan ja viruspartikkelin välillä kasvavan.

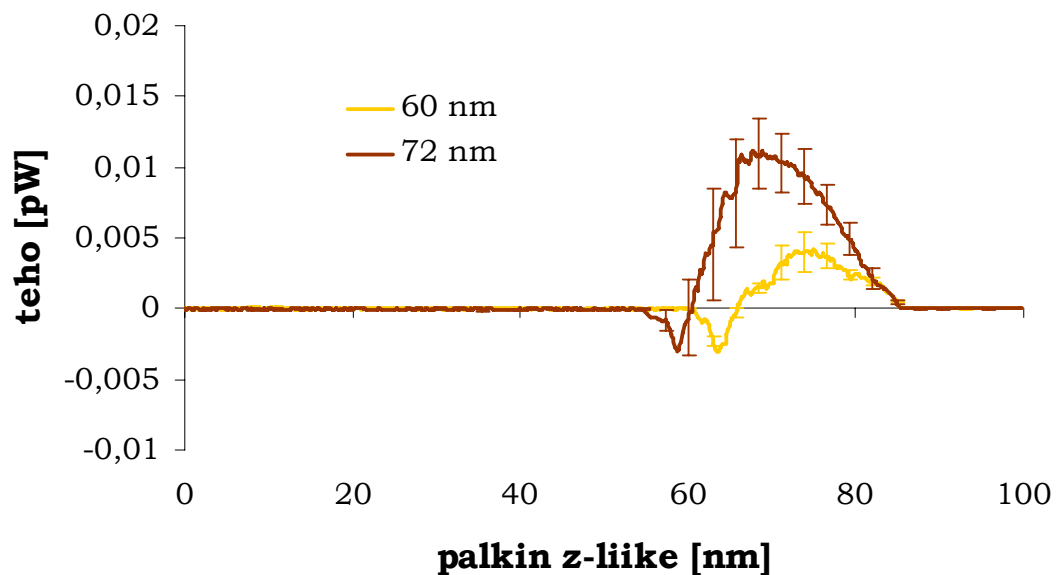


## Energian siirtyminen kärjestä



Kuva 14: Kärjestä pintaan siirtyvän energian teho kahdella eri vapaan amplitudin arvolla.

## Ero näytepintaan



Kuva 15: Energian siirtymisen tehon ero viruspartikkelin ja vastaavan mittauksen näytepinnan välillä kahden eri vapaan amplitudin arvolla.

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

### 5.1 AFM kuvantaminen kuivassa ympäristössä

Tutkimuksen ensimmäinen tavoite oli saada AFM kuvaus kuivassa ympäristössä toimimaan moitteettomasti. Se onnistuikin, paljolti uusien kärkien kokeilun myötä. Kuvissa 4-6 on erilaisia kuvia kuivissa olosuhteissa kuvatuista viruspartikkeleista. Koska tyhjien ja täysien viruspartikkeleiden välillä ei näy havaittavaa eroa, voidaan niiden päätellä olevan rakenteeltaan hyvin samankaltaisia. Partikkelit erottuvat hyvin ja ne ovat homogeenisia. Saman näytteen viruspartikkeleiden samankaltaisuus näkyy erityisesti kuvassa 6, jossa kolmen eri viruspartikkelin profiilit ovat lähes identtiset. Kuvassa näkyvä partikkeleiden leveys riippuu osaltaan käytössä olevan kärjen terävyydestä ja se voi vaihdella eri kuvauskertojen välillä, mutta korkeuden AFM kuvaa tarkasti. Peruskuvaamisen suurimpana tavoitteena oli saada viruspartikkeleista niin tarkkoja kuvia, että niiden yksityiskohtainen rakenne näkyisi. AFM-kuvia tarkempaan rakenteen määrittämiseen on moniakin keinoja, eikä AFM tuo siinä mielessä uutta tietoa cpv-tutkimukseen. AFM:llä saadaan kuitenkin kuvia viruspartikkeleista ilman vahvoja käsittelyjä, joten se tuo tietynlaista lisäarvoa ja varmistusta aikaisemmille tutkimuksille. Kuznetsov ryhmineen on kuvannut useita eri biologisia näytteitä yksityiskohtaisesti. Kohteina ovat olleet esimerkiksi Mason-Pfizer monkey virus (Kuznetsov, Y.G. ym., 2006, Kuznetsov, Y.G. ym., 2006) ja chlorella virus PBCV-1 (Kuznetsov, Y.G. ym., 2005). Kuvien avulla on saatu uutta tietoa partikkeleiden rakenteista. Tutkimukset on pääasiassa tehty nesteympäristössä. Tutkitut virukset ovat olleet suuria verrattuna parvovirusiin, niiden halkaisija ovat n. 83 nm ja 190 nm.

Parvoviruspartikkeleiden halkaisija on vain n. 26 nm (Tsao, J. ym., 1991), eli paljon pienempi kuin muiden AFM:llä tarkemmin kuvattujen virusten halkaisijat. Partikkeleiden pieni koko asettaa kuvaamiselle lisää haastetta ja vaikeuksia. Rakenteiden tarkemmalle määrittämiselle on tällä hetkellä muutama isompi este. Ensimmäinen liittyy näytteiden valmistukseen. AFM:n kärki vaikuttaa kuvattavan kohteen leveyteen ja muotoon paljon, tämän ilmiön kumoamiseksi viruspartikkelit pitäisi saada tiiviiksi kerrokseksi näytepintaan. Tällaisen näytepinnan etuna olisi myös saavutettu symmetrisyys, jonka

avulla säännöllisiä rakenteita voitaisiin paremmin selvittää. CPV-partikkeleiden fysikaalisten ominaisuuksien vuoksi tiiviin näytepinnan valmistaminen on kuitenkin haasteellista. Toisena ongelmana on tällä hetkellä laitteisto. Nykyisellä Jyväskylässä käytössä olevalla AFM:llä on vaikea saavuttaa niin hyvää resoluutiota, kuin tutkimuksellisesti merkityksellisten kuvien saaminen vaatisi. Nesteympäristössä vastaavan resoluution saavuttaminen on vielä vaikeampaa, jopa mahdotonta. Tässä tutkimuksessa pääpaino oli edetä elastisuusmittausten suorittamiseen, joten peruskuvaamisen laatu oli tarpeeksi hyvä.

## **5.2 AFM kuvantaminen nesteympäristössä**

Nestekuvantamisen suurin etu biologisissa näytteissä on luonnollinen kuvausympäristö. Se takaa parhaiten partikkeleiden oikean rakenteen ja dynamiikan säilymisen. Näytteiden valmistus on haasteellisempaa kuin kuivassa ympäristössä suoritettua kuvantamista varten ja tavoitteena olikin pelkästään onnistua kuvantamaan viruspartikkeleita nesteympäristössä. Ongelmia kuvantamisessa aiheuttivat useat eri seikat. Ensimmäiseksi viruspartikkelit piti saada pysymään näytepinnalla tarpeeksi vahvasti. Kuvaus kohdistaa näytteeseen voiman, joka varsinkin nesteympäristössä saattaa irrottaa partikkeleita kesken kuvauksen, sillä kiinnittyminen näytepintaan on heikompi. Kokeilluista vaihtoehdoista kuvaus saatiin onnistumaan parhaiten poly-l-lysiiniä (PLL) ja glutaraldehydiä (GA) käyttämällä. Muut näytepinnat eivät tuottaneet edes tyydyttävä tulosta. Kuvassa 4 näkyy selvästi ero kuiva- ja nesteympäristössä kuvattujen näytteiden välillä. Molemmilla näytteillä valmistustapa oli sama yksittäistä pesua ja kuivausta lukuun ottamatta. Kuivakuvauksessa GA-käsittelyn jälkeen viruspartikkelit näkyvät hyvin selvästi, varsinkin vaihe-kuvassa. Erot kuvien välillä johtuvat osittain kuvauskärjistä, sillä nesteympäristössä palkin jousivakion täytyy olla erilainen verrattuna kuivakuvaukseen. Se selittää erot partikkeleiden koon suhteen, sillä kärjen terävyydellä ja muodolla on kokoon suuri vaikutus.

Nesteympäristössä suuri ongelma oli kärjen likaantuminen. Tämä saattaa johtua glutaraldehydistä, joka tarttuu kärkeen kuvantamisen edetessä. Ongelmana voivat olla myös muut pintaan heikommin tarttuneet epäpuhtaudet, jotka kuivaa ympäristöä käytettäessä irtoavat voimakkaampien pesujen aikana. Kuivassa ympäristössä kärjen

likaantuminen ei ollut yhtä suuri ongelma vastaavalla käsittelyllä. Nesteympäristössä saatiin parhaimmillaankin vain muutamia hyvän laatuksia kuvia ennen kärjen lopullista likaantumista. Oikeiden kuvantamisasetusten löytäminen ja laitteiston säätäminen vei myös enemmän aikaa, mistä johtuen kärki ehti helpommin likaantua ennen kunnollisen kuvantamisen aloittamista. Kuvassa 5B partikkelit näkyvät selvästi nesteympäristössä. Tästä voimme päätellä, että PLL ja GA kiinnitys toimii ja pitää partikkelit paikoillaan. Partikkeleiden muoto ja koko leveysuunnassa johtuvat kärjen likaantumisesta, johon täytyy vielä etsiä ratkaisua.

Nesteympäristössä kuvaamisen kehittäminen on suuresti kiinni näytteiden valmistuksesta. Näytepinta pitäisi valmistaa tavalla, jolla se jää mahdollisimman stabiiliksi, eikä likaa kärkeä. Myös mahdollisista epäpuhtauksista pitäisi päästä nykyistä paremmin eroon. Elastisuusmittauksia varten voitaisiin yrittää valmistaa vähemmän käsiteltyjä näytteitä päällystämällä pinta glutaraldehydillä ennen virusliuoksen lisäämistä, jolloin se ei stabiloisi viruspartikkeleita niin voimakkaasti. GA kuitenkin kiinnittäisi viruspartikkelit kovalenttisesti näytepintaan kiinni. Kokeilematta on vielä myös useita erilaisia yleisesti käytettyjä kiinnitystapoja, kuten silaaniyhdisteet (esim. APS). Varsinkin biologisissa sovellutuksissa kuvattavan näytteen ominaisuudet vaikuttavat paljon siihen, kuinka hyvin näyte saadaan kiinni pintaan. CPV:n isoelektrinen piste on n. 5,2, eli viruspartikkelilla on negatiivinen kokonaisvaraus (Yuan, W., ja Parrish, C.R., 2001/1/20), toisaalta CPV partikkelin pinnalla vallitsee positiivinen varaus (Shepherd, C.M. ym., 2006). Mineraalikiilteen pinta on negatiivisesti varautunut, jolloin viruspartikkelin sitoutumiskyvyn ratkaisee, hallinnoiko sitoutumisessa partikkelin sisältä tuleva mahdollisesti voimakas kokonaisvaraus vai pinnan vastakkainen heikompi varaus.

Eri tutkimuskohteella nestekuvauksen onnistuminen saattaisi olla helpompaa, jonka jälkeen painelumittauksiin siirtyminen olisi mahdollista. Kehitettävää löytyy myös kuvaamisen tekniikasta ja sen hienosäädöstä. Erityisesti nesteympäristössä kuvaamiseen liittyy paljon erilaisia vuorovaikutuksia ja fysikaalisia ilmiöitä, joiden tunnistaminen on tärkeää. Esimerkiksi puskurin ionikoostumus ja pH-arvo voivat vaikuttaa kuvaamistulokseen paljon. Kärjen ja näytepartikkeleiden varaukset ovat isoelektrisen pisteensä kautta riippuvaisia kuvauspuskurin pH-arvosta ja sen muuttuessa varaukset voivat vaihdella samoista vastakkaisiin. Varusero vaikuttaa kuvausresoluutioon hyvin

merkittävästi, sillä se muuttaa voima-alueita, joilla kärki näytteen tunnistaa. Alhainen suolakonsentraatio voi aiheuttaa pintaan varauksen, jonka johdosta kärki kimpoaa näytteen pinnalta pois liian aikaisin ja näin huonontaa kuvausresoluutiota (Rossell, J.P. ym., 2003). Ko. asioiden hallitseminen syntyy kokemuksen ja oppimisen kautta, jolloin työskentelystä tulee entistä varmempaa ja rutiininomaisempaa.

### 5.3 Elastisuusmittausten periaate

Elastisuuskuvaajista (kuva 8) nähdään selkeä ero viruspartikkeleihin ja näytepintaan osuneiden paineluiden välillä. Viruspartikkeleiden taipuman lähestymiskäyrä on hyvin portaittainen. Tästä voimme päätellä, että partikkelin rakenne antaa periksi asteittain sen sijaan että se tasaisesti painuisi sisään. Rakenne saattaa antaa kokonaisuudessaan periksi tai kärki voi rikkoa proteiiniukuorta ja painua sen sisään. Asteittaisuus viittaa ainakin osittaiseen rakenteiden murtumiseen, joita saattaa tapahtua kapsidissa. Taipuman loittonemiskäyrä on puolestaan paljon lähempänä näytepinnan vastaavaa. Tästä voidaan päätellä, että partikkeli ei ainakaan täysin palaudu kärjen nousemisen mukana. Mitä suurempi ero lähenemis- ja loittonemiskäyrien välillä on, sitä vähemmän partikkeli palautuu välittömästi. Täysin elastisella tai kovalla partikkelilla nämä käyrät olisivat identtisiä.

Amplitudikuvaajista näkyy myös selkeitä eroja näytepinnan ja viruspartikkelin välillä. Kärjen ja pinnan välillä on paljon enemmän vuorovaikutuksia viruspartikkelin kohdalla kuin näytepinnalla ja näin ollen värähtelyn amplitudi ei vaimene lineaarisesti. Kärki saattaa myös hetkellisesti tarttua pintaan, jolloin amplitudi vaihtelee irrotessaan. Muutokset vaihe-erossa johtuvat samasta seikasta. Koska ero syntyy ajetun ja mitatun värähtelyn muutoksesta, partikkelin aiheuttamat muutokset amplitudissa vaikuttavat vaihe-eroon vastaavissa kohdissa kuvaajia. Kaikista näistä eroista näytepintaan ja viruspartikkeliin osuneiden paineluiden välillä voi päätellä parhaiten partikkelin päälle osuneet painelut. Tämä auttaa suuresti tulosten tulkinnessa, sillä mittauksista voidaan karsia pois sellaiset, jotka eivät ajautumisen vuoksi ole osuneet haluttuun kohteeseen.

## 5.4 Partikkeleiden korkeuden muutokset

Viruspartikkeleiden alkukorkeuksien jakautumisen kahteen eri luokkaan voi havaita kuvan 9 ensimmäisistä pylväistä, jotka kuvaavat partikkeleiden korkeuksia ennen painelukokeiden aloittamista. Röntgensädekristallografian perusteella viruspartikkeleiden halkaisija on n. 26 nm (Tsao, J. ym., 1991). Korkeiden partikkeleiden keskimääräinen korkeus oli hieman alle 25 nm, joten ne ovat luultavasti säilyttäneet rakenteensa paremmin näytteen valmistuksen yhteydessä. Partikkeleiden korkeuseroon voi vaikuttaa mm. näytteiden kuivusasteella. Koska näytteiden kuivaus tehtiin aina käsin, vaihteli siihen käytetty aika eri näytteiden kohdalla. Kaikesta kosteudesta ei koskaan päästä eroon ja varsinkin ilmankosteuden havaittiin vaikuttavan mittauksen onnistumiseen. Kuivaamisesta huolimatta näytteen pintaan jää aina ohut vesikerros, jonka suuruus myös vaikuttaa näytteen kosteuteen (Zhifeng Shao ym., 1996). Yksittäisissä näytteissä partikkeleiden korkeudet olivat aina hyvin identtisiä, mikä tukee ajatusta kuivusasteen vaikutuksesta korkeuteen. Matalat partikkelit saattoivat olla kuivempia kuin korkeat. Kuivuessaan kapsidin proteiinikuori mahdollisesti kutistuu ja saattaa muuttua vähemmän kimmoisaksi, sillä rakenteita ympäröivät ja levittävät vesimolekyylit vähenevät. Tämä ilmiö näkyy hyvin mittauksista. Matalien partikkeleiden korkeus ei muutu suuresti painamisen seurauksena (kuva 10). Korkeiden partikkeleiden korkeuden muutokselle todennäköinen selitys on se, että partikkelit muuttavat muotoaan, antavat periksi sivusuunnassa. Matalampien partikkeleiden proteiinirakenne on mahdollisesti sen verran jäykempi, että vastaavaa liikettä ei enää tapahdu yhtä helposti.

Toinen ero erikorkuisten partikkeleiden välillä löytyy korkeuden muutoksesta painelukokeiden aikana (kuvat 11-13). Korkeiden partikkeleiden korkeuden muutos on suurempi, enimmillään 15 nm eli yli puolet partikkeleiden korkeudesta. Partikkeleiden voidaan siis sanoa olevan hyvin elastisia, sillä painamisen jälkeen korkeuden muutos oli suurimmallakin voimalla vain n. 3 nm (kuva 10). Lisäksi jokaisen eri voimalla tehdyn painelun lopussa on nähtävissä huippu, jossa korkeuden muutos oli alkua nopeampaa. Koska mittauksessa käytettävä voima on suoraan verrannollista palkin taipumaan (kaava 1), lisääntyy voima lineaarisesti taipuman kasvaessa. Korkeampi voima tarkoittaa siis pidemmälle mennyttä taipumaa, ei alusta asti voimakkaampaa painamista. Tämän perusteella identtisiä partikkeleita painettaessa eri voimilla tapahtuneiden paineluiden

kuvaajien alkuarvojen pitäisi olla samat, suuremmalla voimalla mittaus vain etenee pidemmälle. Korkeiden partikkeleiden kohdalla kolmella ensimmäisellä voimalla suoritettujen paineluiden kuvaajat alkavat samankaltaisesti, mutta viimeinen käyrä on selvästi alhaisempi. Kolmannen painelun (105 nN) kuvaajasta voi nähdä suhteessa suuremman loppuromahduksen verrattuna kahteen aiempaan paineluun. Tämän romahduksen jälkeen viruspartikkelit eivät luultavasti ehdi palautua, joten partikkelit eivät enää anna vastaavaa määrää periksi viimeisen painelun yhteydessä. Myös korkeampien partikkeleiden korkeuden muutos (kuva 11) on n. 1 nm kolmannen painelun jälkeen. Huomattavin muutos tapahtuu kuitenkin viimeisen voiman jälkeen. Painamisen aikana korkeus romahtaa kuvaajan lopussa, myös mitattu korkeuden muutos painelun jälkeen on huomattavasti suurempi kuin aiemmin, n. 3 nm (kuva 10). Vastaava ilmiö nähdään lievempänä myös matalien partikkeleiden kuvaajassa (kuva 12). Suurimmalla voimalla tehdyn mittauksen aikana partikkelin painuminen oli hivenen pienempää kuin pienemmillä voimilla, jotka kaikki aiheuttivat n. 2 nm suuremman painuman. Kummankin kokoisista partikkeleista voidaan siis päätellä, että painelut saattoivat aiheuttaa pidempiaikaisia vaikutuksia partikkeleiden elastisuuteen.

Partikkelit pysyivät kaikissa mittauksissa silmämääräisesti ehjinä, eikä niiden rakenteen kunnollista rikkoutumista havaittu. Tämä viittaa viruspartikkeleiden rakenteen olevan hyvin kestävä kuivissa olosuhteissa. Tutkimuksia jatkettaessa olisi mahdollista nähdä, kuinka nesteympäristö vaikuttaa partikkeleiden kestävyteen. Samankaltaisia mittauksia nesteympäristössä on tehty vihreälle fluoresoivalle proteiinille (green fluorescent protein, GFP), jonka fluoresenssi katosi 5 nN voimalla painamisen jälkeen (Kodama, T. ym., 2005/11). Samansuuruisilla voimilla on paineltu myös bakteriofageja nesteympäristössä. Rakenteessa havaittiin muutoksia n. 2,5 nN voimalla painettaessa. Lisäksi partikkelit saatiin tuhoutumaan, kun niitä kuvattiin pidempiaikaisesti lähes 1 nN voimalla. Rakenteeltaan kuvattu bakteriofagi muistuttaa sylinteriä, jonka päät omaavat ikosahedraalisen symmetrian (Ivanovska, I.L. ym., 2004). Ikosahedraalisena partikkelina CPVn rakenteessa on samankaltaisuutta tutkitun bakteriofagin kanssa. CPV-partikkeleihin kohdennettu voima oli suurimmillaan 150 nN, joka on huomattavasti suurempi kuin nesteympäristössä suoritettujen mittausten tulokset. Tämän tiedon valossa voi olla mahdollista, että myös cpv-partikkelit olisivat nesteympäristössä paljon heikompia. Nesteympäristössä tehtävien paineluiden tuloksia voi yrittää arvioida nykyisten

kuivatulosten perusteella. Koska mittauksissa huomattiin eroja eri kuivuusastetta olevien viruspartikkeleiden välillä, luultavasti vastaavat erot kasvavat, jos mittaukset tehdään täysin kosteassa ympäristössä eli nesteessä. Partikkeleiden elastisuus mahdollisesti lisääntyy entistä enemmän nesteympäristössä. Matalampien partikkeleiden, jotka oletettavasti olivat siis kuivempia, korkeus ei muuttunut suuresti paineluiden tuloksena. Korkeiden partikkeleiden korkeus sen sijaan muuttui selvästi. Voi siis olla, että nesteympäristössä partikkeleiden korkeus muuttuisi vielä enemmän ja pysyvämmiin. Tämä voi tarkoittaa partikkeleiden mukautuvuuden kasvun lisäksi sitä, että ne saattaisivat rikkoutua kokonaan.

Painelumittausten suorittaminen kuivassa sisältää useampia ongelmakohtia. Suurin niistä on nesteympäristöön totuneiden viruspartikkeleiden ominaisuuksien muuttuminen. Kuivana tehdyistä mittauksista ei voi koskaan vetää suoria johtopäätöksiä partikkeleiden ominaisuuksiin nesteympäristössä. Toisaalta virukset usein selviävät pitkiäkin aikoja kuivuudessa säilyttäen infektiivisyytensä, joten kuivien partikkeleiden ominaisuuksilla itsessään voi olla tutkimuksellista merkitystä. Toinen ongelmakohta on partikkeleiden kuivuusasteen määrittäminen. Kuten tutkimuksessa huomattiin, vaikuttaa partikkeleiden kuivuusaste tuloksiin huomattavasti. Partikkeleiden kuivuusastetta on hyvin vaikea, jopa mahdoton määrittää. Ongelmia tulee varsinkin suuremman aineiston keruussa, jossa täsmälleen samat mittausolosuhteet olisivat tärkeitä. Osaltaan viruspartikkeleiden korkeus ilmeisesti korreloi kuivuusasteen kanssa, mutta sen tarkkuudesta ei ole minkäänlaista tietoa. Onkin siis vaikeaa edes määrittellä käsitettä ”kuiva viruspartikkeli” puhumattakaan sen tarkkojen ominaisuuksien mittaamisesta.

Tulevaisuudessa painelumittauksia voi hyödyntää usealla eri tavalla. CPV-partikkelit tunkeutuvat soluun sisälle endosytoottisista reittiä pitkin. Viruspartikkeleiden aktivoituminen ja vapautuminen sytoplasmaan ovat tutkimusten mukaan sidoksissa pH-arvon laskun aiheuttamiin muutoksiin viruspartikkeleiden rakenteessa (Suikkanen, S. ym., 2003). Tämän tiedon nojalla olisi mielenkiintoista tutkia, vaikuttaako eri pH-arvoisilla puskureilla käsittely viruspartikkeleiden kestävyys. Kuivakuvauksella tämä onnistuisi pitämällä viruspartikkeleita eri pH-arvoisissa puskureissa ennen kuvausta. Mahdollisesti voitaisiin selvittää myös, vaikuttaako pH-käsittelyn aika ratkaisevasti muutoksiin



kapsideissa. Muutosten tulisi olla kuitenkin selkeitä, jotta ne voitaisiin varmuudella erottaa pelkästään kuivuusasteen aiheuttamista eroista.

Jos nesteympäristössä kuvaamista onnistutaan kehittämään niin, että painelumittaukset onnistuvat, luo se paljon uusia mahdollisuuksia. Viruspartikkeleiden kestävydestä saataisiin tarkkaa tietoa niiden luontaisessa ympäristössä, eikä kuivuusasteesta tarvitsisi huolehtia. Lisäksi nesteympäristön muuntelumahdollisuudet olisivat suuret. Mittaukset voitaisiin suorittaa suoraan halutussa pH-arvossa ilman kuivaamista. Voitaisiin tutkia myös erilaisten ympäristöjen vaikutusta viruspartikkeleiden kestävyteen, kuten eri ionikonsentraatioiden. EDTA estää viruksen lipidikalvoihin kiinnittymisen, joten  $\text{Ca}^{2+}$ -ionit mahdollisesti vaikuttavat näihin sitoutumisiin (Suikkanen, S. ym., 2003). Tämän perusteella voitaisiin tutkia syntykö kapsidin kestävyteen eroja ympäristöissä, joissa  $\text{Ca}^{2+}$ -ionien pitoisuudet olisivat erilaisia. Tekniikalla on siis useitakin mahdollisia sovelluksia tulevaisuudessa, minkä vuoksi painelumittausten kehittämisen kannattaa panostaa. AFM:n parhaimpia ominaisuuksia biologisten sovellusten kohdalla on selkeästi erilaisten voimamittausten hyväksikäyttö, sillä muita tekniikoita vastaavien asioiden selvittämiseen ei ole.

## 5.5 Energian siirtyminen kärjestä pintaan

Palkin vapaan amplitudin arvoa muuttamalla saatiin tietoa energian siirtymisestä kärjestä viruspartikkeliin. Oletetusti vapaan amplitudin suuruus vaikuttaa kärjestä kohteeseen siirtyneeseen energiaan, kuten voi havaita kuvista 14 ja 15. Koska suuremmalla vapaalla amplitudilla kärki liikkuu laajemmalla alueella, se myös alkaa saavuttaa tutkittavaa pintaa aikaisemmassa vaiheessa verrattuna pienempään vapaaseen amplitudiin. Kuvassa 15 näkyy erotus, jossa virukseen osuneesta painelusta on vähennetty vastaavalla vapaalla amplitudilla näytepintaan kohdistunut painelu. Kuvasta voidaan havaita, että suuremmalla vapaalla amplitudilla siirtynyt energia on suurempi. Koska kummastakin kuvaajasta on vähennetty vastaavalla arvolla näytepintaan kohdistunut painelu, syntyvät erot viruspartikkelin suuremmasta vaikutuksesta mittaukseen, eivätkä vapaan amplitudin muutoksesta, kuten kuvassa 14 näkyvät suurimmat erot. Suurin ero kuvan 15 mukaan syntyy painelun puolivälissä. Parhaimmillaan tämä ero on 0,01 pW, eli hyvin pieni. Korkeammalla vapaan amplitudin arvolla saatu energian siirtyminen kärjen ja

viruspartikkelin kontaktin syntymisen jälkeen oli n. 0,015 pW. Vertailun vuoksi vastaavalla kaavalla laskettujen energian siirtymisen energian määrät polypropyleeni-matriksille ja polyuretaani partikkeleille olivat ylimmillään 0,8 pW ja 2,4 pW (Anczykowski, B. ym., 1999/2).

Energian siirtymisen laskeminen muuttuu mielenkiintoisemmaksi, jos nesteympäristössä viruspartikkelit saadaan kunnolla hajoamaan. Silloin voitaisiin arvioida tähän vaadittavaa energiaa ja tätä kautta myös partikkelin sidosenergioiden suuruutta.

## LÄHDELUETTELO

- Anczykowski, B., Gotsmann, B., Fuchs, H., Cleveland, J.P., and Elings, V.B. 1999/2. How to measure energy dissipation in dynamic mode atomic force microscopy. *Applied Surface Science*. 140:376-382.
- Barr, M. 2002. Closed-Loop Control. *Embedded Systems Programming*. August:55-56.
- Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. 1986. Atomic force microscope. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*. 56:930-933.
- Cotmore, S.F., and Tattersall, P. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv.Virus Res.* 33:91-174.
- Crawford, B.J., and Burke, R.D. 2004. TEM and SEM methods. *Methods Cell Biol.* 74:411-441.
- da Silva, L.P. 2002. Atomic force microscopy and proteins. *Protein Pept.Lett.* 9:117-126.
- Dauter, Z. 2006. Current state and prospects of macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 62:1-11.
- El Kirat, K., Burton, I., Dupres, V., and Dufrene, Y.F. 2005. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *J.Microsc.* 218:199-207.
- Florin, E.L., Moy, V.T., and Gaub, H.E. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*. 264:415-417.
- Gould, S.A., Burke, K., and Hansma, P.K. 1989. Simple theory for the atomic-force microscope with a comparison of theoretical and experimental images of graphite. *PHYSICAL REVIEW B.CONDENSED MATTER*. 40:5363-5366.
- Haggerty, L., and Lenhoff, A.M. 1993. STM and AFM in biotechnology. *Biotechnol.Prog.* 9:1-11.
- Hansma, H., and Pietrasanta, L. 1998. Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 2:767.
- Hansma, H.G., and Laney, D.E. 1996. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys.J.* 70:1933-1939.
- Hansma, P.K., Elings, V.B., Marti, O., and Bracker, C.E. 1988. Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. *Science*. 242:209-216.
- Hegner, M., Wagner, P., and Semenza, G. 1993. Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy. *Surface Science*. 291:39-39-46.

- Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher, K., and Schindler, H. 1996. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:3477-3481.
- Hurtado, A., Rueda, P., Nowicky, J., Sarraseca, J., and Casal, J.I. 1996. Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. *J.Virol.* 70:5422-5429.
- Hussain, M.A., Agnihotri, A., and Siedlecki, C.A. 2005. AFM imaging of ligand binding to platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 receptors reconstituted into planar lipid bilayers. *Langmuir.* 21:6979-6986.
- Idiris, A., Kidoaki, S., Usui, K., Maki, T., Suzuki, H., Ito, M., Aoki, M., Hayashizaki, Y., and Matsuda, T. 2005. Force measurement for antigen-antibody interaction by atomic force microscopy using a photograft-polymer spacer. *Biomacromolecules.* 6:2776-2784.
- Ivanovska, I.L., de Pablo, P.J., Ibarra, B., Sgalari, G., MacKintosh, F.C., Carrascosa, J.L., Schmidt, C.F., and Wuite, G.J. 2004. Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:7600-7605.
- Jongeneel, C.V., Sahli, R., McMaster, G.K., and Hirt, B. 1986. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J.Virol.* 59:564-573.
- Karrasch, S., Dolder, M., Schabert, F., Ramsden, J., and Engel, A. 1993. Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution. *Biophys.J.* 65:2437-2446.
- Kluger, R., and Alagic, A. 2004. Chemical cross-linking and protein-protein interactions-a review with illustrative protocols. *Bioorg.Chem.* 32:451-472.
- Kodama, T., Ohtani, H., Arakawa, H., and Ikai, A. 2005/11. Observation of the destruction of biomolecules under compression force. *Ultramicroscopy.* 105:189-195.
- Kuznetsov, Y.G., Gurnon, J.R., Van Etten, J.L., and McPherson, A. 2005. Atomic force microscopy investigation of a chlorella virus, PBCV-1. *J.Struct.Biol.* 149:256-263.
- Kuznetsov, Y.G., Ulbrich, P., Haubova, S., Ruml, T., and McPherson, A. 2006. Atomic Force microscopy investigation of Mason-Pfizer monkey virus and human immunodeficiency virus type 1 reassembled particles. *Virology.*
- Lee, G.U., Kidwell, D.A., and Colton, R.J. 1994. Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy. *Langmuir.* 10:354-357.
- Magonov, S.N., Elings, V., and Whangbo, M.-. 1997/4/1. Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surface Science.* 375:L385-L391.
- Michel, J.P., Ivanovska, I.L., Gibbons, M.M., Klug, W.S., Knobler, C.M., Wuite, G.J., and Schmidt, C.F. 2006. Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects

- of capsid protein mutations on elasticity and strength. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:6184-6189.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., and Waldron, K.C. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques.* 37:790-6, 798-802.
- Muller, D.J., Engel, A., and Amrein, M. 1997. Preparation techniques for the observation of native biological systems with the atomic force microscope. *Biosensors and Bioelectronics.* 12:867-877.
- Nettikadan, S.R., Johnson, J.C., Mosher, C., and Henderson, E. 2003. Virus particle detection by solid phase immunocapture and atomic force microscopy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 311:540-545.
- Parrish, C.R. 1990. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Adv.Virus Res.* 38:403-450.
- Radmacher, M. 2002. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Methods Cell Biol.* 68:67-90.
- Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C.M., Cleveland, J.P., and Hansma, P.K. 1996. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys.J.* 70:556-567.
- Ricci, D., and Braga, P.C. 2004a. Imaging methods in atomic force microscopy. *Methods Mol.Biol.* 242:13-23.
- Ricci, D., and Braga, P.C. 2004b. Recognizing and avoiding artifacts in AFM imaging. *Methods Mol.Biol.* 242:25-37.
- Rossell, J.P., Allen, S., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J., and Williams, P.M. 2003. Electrostatic interactions observed when imaging proteins with the atomic force microscope. *Ultramicroscopy.* 96:37-46.
- Sheng, S., Czajkowsky, D.M., and Shao, Z. 1999. AFM tips: how sharp are they? *J.Microsc.* 196:1-5.
- Shepherd, C.M., Borelli, I.A., Lander, G., Natarajan, P., Siddavanahalli, V., Bajaj, C., Johnson, J.E., Brooks, C.L.,III, and Reddy, V.S. 2006. VIPERdb: a relational database for structural virology. *Nucl. Acids Res.* 34:D386-389.
- Shlyakhtenko, L.S., Gall, A.A., Filonov, A., Cerovac, Z., Lushnikov, A., and Lyubchenko, Y.L. 2003. Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials. *Ultramicroscopy.* 97:279-287.
- Stuart, J.K., and Hlady, V. 1995. Effects of Discrete Protein-Surface Interactions in Scanning Force Microscopy Adhesion Force Measurements. *Langmuir.* 11:1368-1374.

Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., and Vuento, M. 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology*. 316:267-280.

Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., and Compans, R.W. 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*. 251:1456-1464.

Vihinen-Ranta, M., Suikkanen, S., and Parrish, C.R. 2004. Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J.Virol.* 78:6709-6714.

Yuan, W., and Parrish, C.R. 2001/1/20. Canine Parvovirus Capsid Assembly and Differences in Mammalian and Insect Cells. *Virology*. 279:546-557.

Zhifeng Shao, Jianxun Mou, Czajkowsky, D.M., Jie Yang, and Jian-Yang Yuan. 1996. Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed. *Adv.Phys.* 45:1.