

Smart Composites
International School
For beginners



Международная Школа **SCIS 2021**

Методики практических работ

Калининград, 22 - 29 Августа, 2021



Российский
научный
фонд



Research and Education Center
Smart Materials &
Biomedical Applications
IKBFU

Изготовление тонких полимеров:

1. Метод «Dr. Blade»

Изготовление магнитных и пьезонаночастиц:

2. Метод золь-гель
3. Метод соосаждения

Характеризация материалов:

4. Метод вибрационной магнитометрии
5. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)
6. Измерения на атомно-силовом микроскопе (АСМ)
7. Метод оптической спектроскопии
8. Измерение сегнетоэлектрических петель гистерезиса
9. Измерение магнитоэлектрического эффекта
10. Подсчет агрегированных наночастиц в полимере при помощи ImageJ

Характеризация биосовместимости материалов:

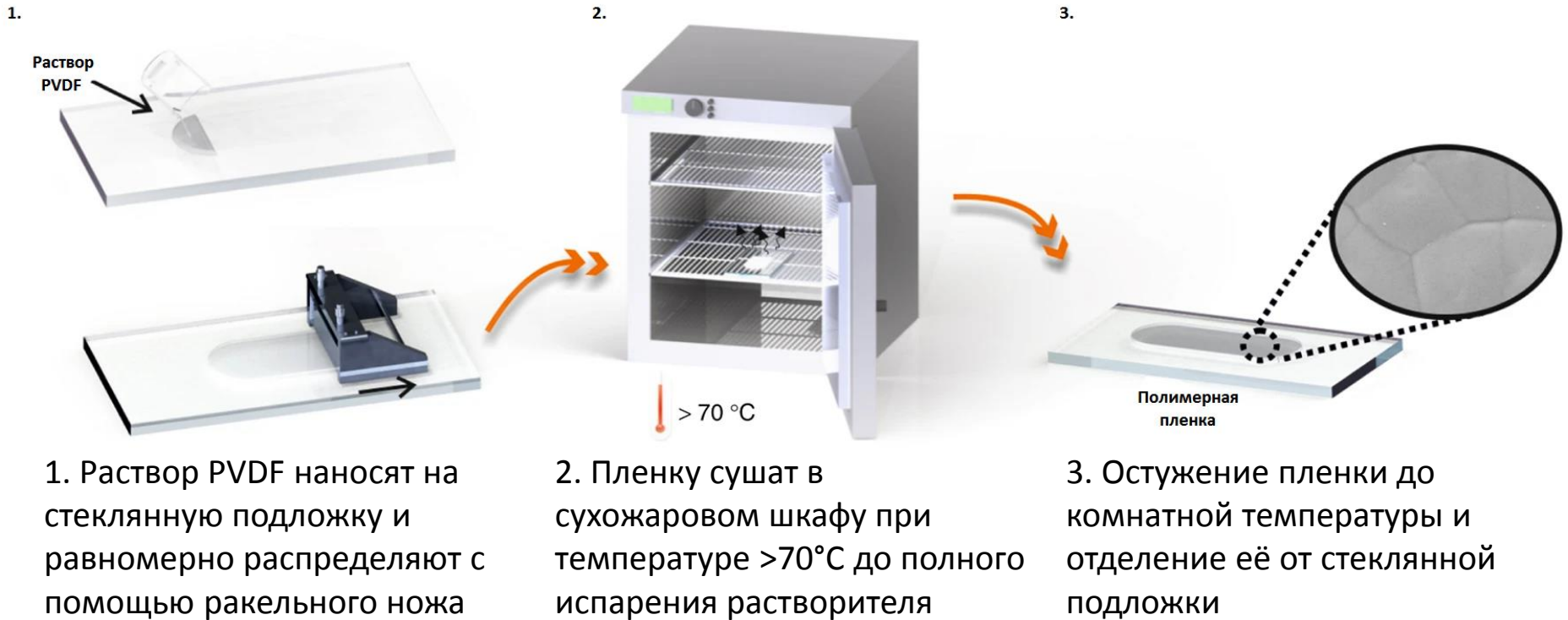
11. Иммутизированные клеточные культуры
12. Пассирование клеточных культур
13. Флуоресцентное окрашивание клеток
14. Подсчет клеток при помощи камеры Горяева и Countess II FL



Изготовление тонких полимеров:

1. Метод «Dr. Blade»

Метод «Dr. Blade» (Метод ракельного ножа) – наиболее широко применяемый метод обработки и производства пленок на жестких и гибких поверхностях большой площади. Пленка образуется путем распределения полимерного раствора по поверхности подложки с помощью лезвия; толщина пленки определяется шириной зазора между лезвием и подложкой, а также массовой долей полимера в растворе.



Больше информации: [doi:10.1038/nprot.2017.157](https://doi.org/10.1038/nprot.2017.157)

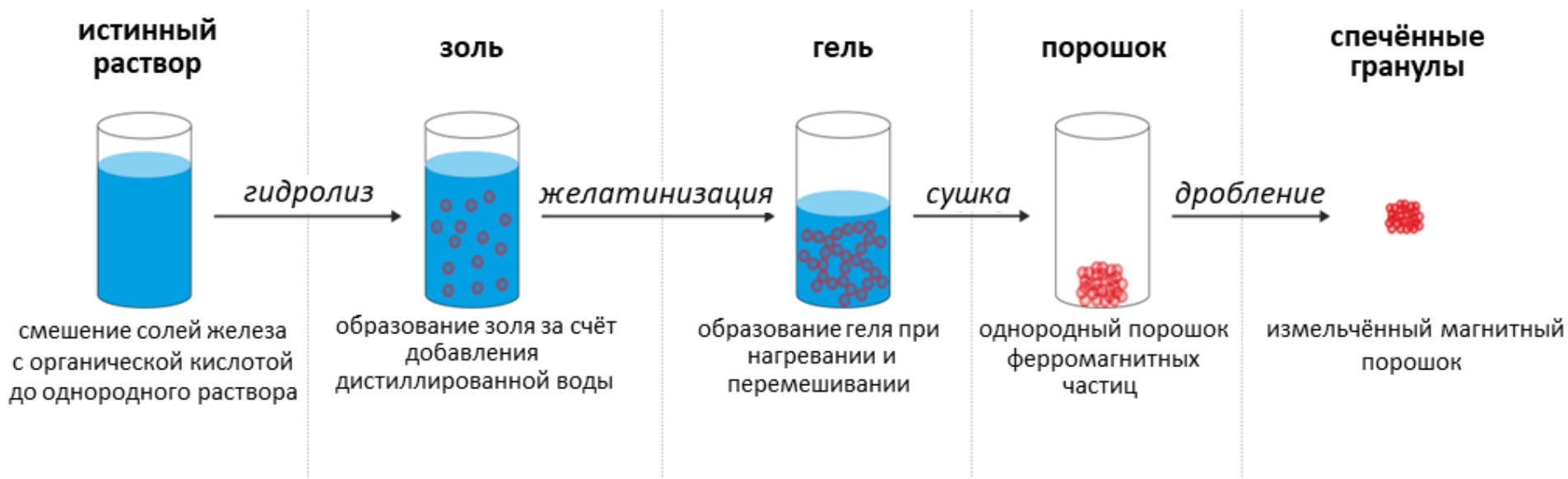


Международная Школа
по Умным Композитным Материалам
для начинающих

Изготовление магнитных наночастиц

2. Получение наночастиц методом золь-геля

Метод золь-гель – технология изготовления материалов и наноматериалов, включающая получение золя с последующим переводом его в гель – коллоидную систему, состоящую из жидкой дисперсионной среды, заключённой в пространственную сетку, образованную соединившимися частицами дисперсной фазы.



Больше информации: <https://doi.org/10.3390/fib5030024>

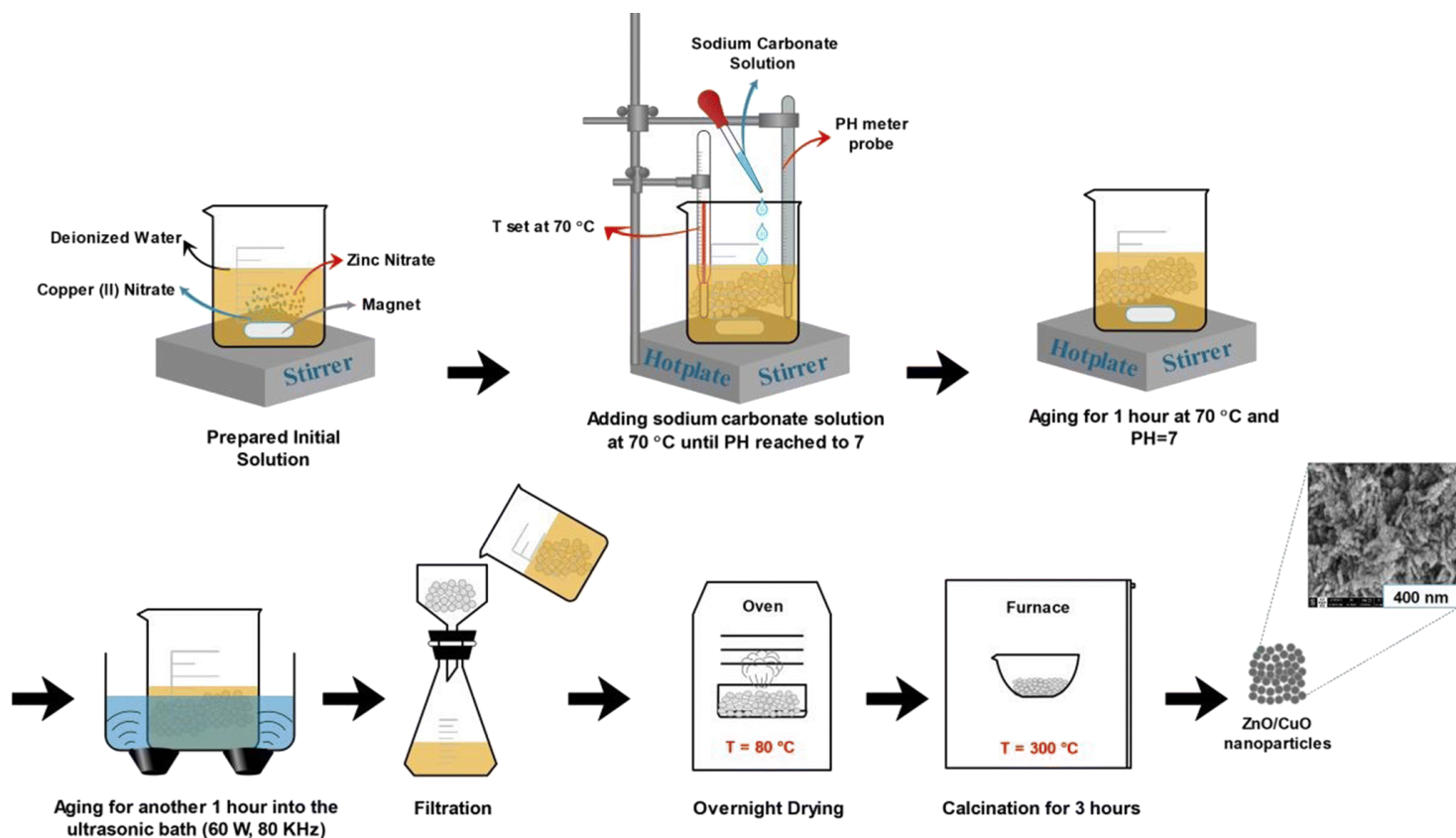


Международная Школа
по Умным Композитным Материалам
для начинающих

Изготовление магнитных наночастиц

3. Получение наночастиц методом соосаждения

Метод соосаждения — один из наиболее легко выполнимых и эффективных методов концентрирования. В раствор, содержащий следовые количества определяемого иона, вводят катион или анион, который осаждают подходящим реактивом в виде малорастворимого соединения. При этом соосаждаются и следы определяемого иона.



Больше информации: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07680-0>



Международная Школа
по Умным Композитным Материалам
для начинающих

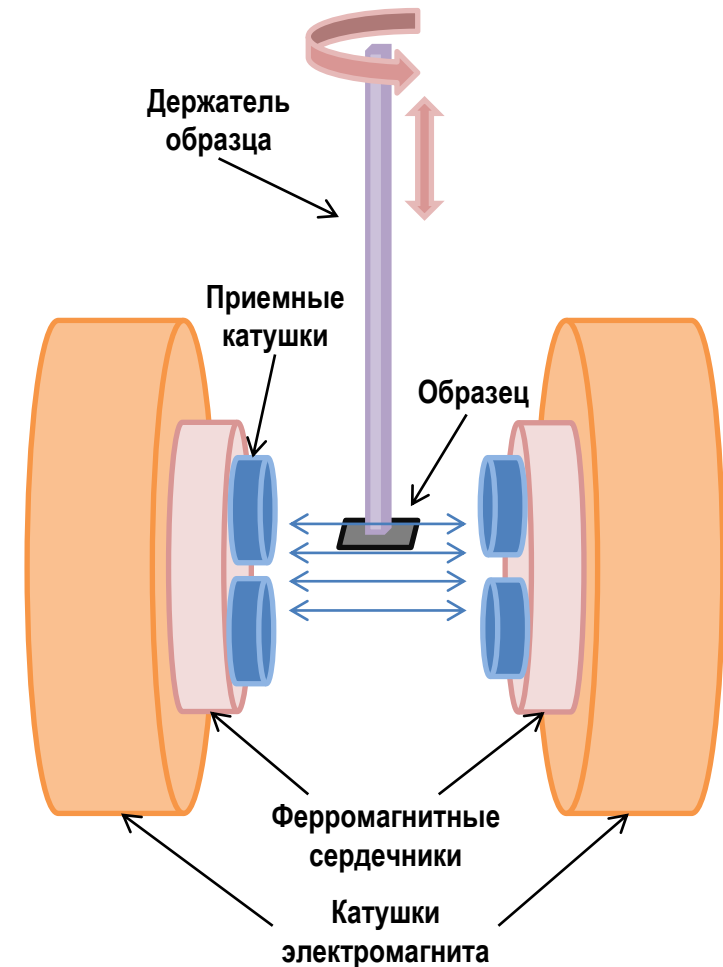
Характеризация материалов:

4. Метод вибрационной магнитометрии

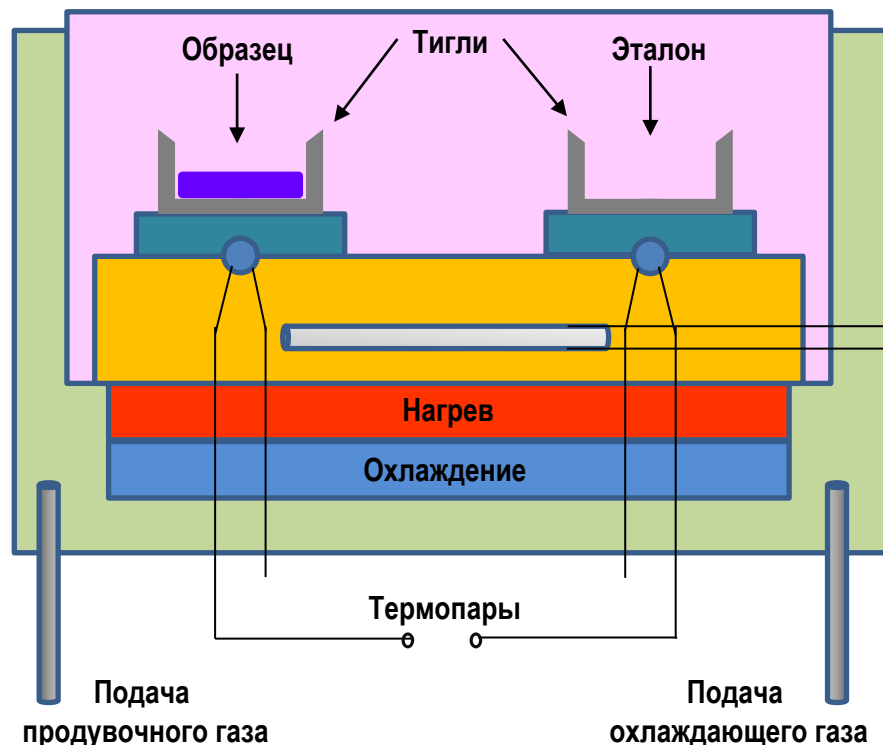
Метод вибрационной магнитометрии - разновидность индукционного метода исследования магнитных свойств материала. Принцип основан на регистрации изменения во времени t электродвижущей силы (ЭДС) E в измерительной катушке при изменении магнитного потока Φ , проходящего сквозь неё, что может быть выражено законом Фарадея: $E = -d\Phi/dt$.

Исследуемый образец объема V с намагниченностью M помещается в однородное постоянное магнитное поле напряжённости H . Образец обладает магнитным моментом m и совершает гармонические колебания с частотой ω и амплитудой A . Колебания создаются генератором механических колебаний - вибратором. При этом ось колебаний параллельна плоскости катушек, а магнитный момент образца, индуцируемый внешним магнитным полем, ориентирован перпендикулярно плоскости катушек. Детектирующие катушки расположены на полюсах электромагнита, представляющего собой устройство, в котором создается магнитное поле при прохождении электрического тока через обмотку, при этом ферромагнитные сердечники, помещенные в магнитное поле, создаваемое обмотками, усиливают его. Магнитное поле, создаваемое электромагнитом, измеряется датчиком Холла, расположенным между полюсами электромагнита. Напряжение на датчике считывается с помощью цифрового преобразователя и передается программе управления на компьютере. Когда образец движется вверх, увеличивается магнитный поток сквозь верхние приемные катушки и уменьшается сквозь нижние. Это приводит к возникновению ЭДС индукции – сигнал, которой усиливается и преобразуется в цифровой. Такая система соединения катушек позволяет выделить полезный сигнал от образца и свести к минимуму паразитные сигналы от внешних магнитных полей.

Больше информации: <http://magn.ru/Rus/prac.html>



5. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)



Калориметрия – группа методов физико-химического анализа, в которых измеряется теплота различных процессов: химических реакций, фазовых переходов, теплоемкость.

Теплота – функция, характеризующая процесс перераспределения внутренней энергии в пространстве. Ее невозможно измерить при отсутствии процесса теплопереноса. Поэтому в конструкции любого калориметра предусмотрена возможность теплообмена между различными частями измерительной системы.

В методе ДСК теплоту определяют через тепловой поток – производную теплоты по времени (отсюда в названии термин «дифференциальная»). Тепловые потоки измеряются по разнице температур в двух точках измерительной системы в один момент времени:

$$\Phi \sim \Delta T = T(x_2) - T(x_1) = f(x).$$

Измерения можно проводить как в изотермических условиях, так и в динамическом режиме при программируемом изменении температуры оболочки (нагревателя) (калориметры такого типа называют «сканирующими»).

Больше информации: doi.org/10.1016/j.matlet.2021.130626



Характеризация материалов:

6. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия – методика исследования морфологии (шероховатости) поверхности образца за счёт регистрации отклонения зонда при попадании в поле действия Ван-дер-Ваальсовых сил исследуемой поверхности. Зонд представляет собой балку (кантилевер) размерами порядка 100-200 мкм с иглой с радиусом закругления порядка 3-8 нм (см. изображение справа).

На иглу зонда могут воздействовать различные силы со стороны поверхности, благодаря чему при помощи атомно-силового микроскопа можно исследовать:

- ✓ Магнитный и сегнетоэлектрический контраст;
- ✓ Механическую жёсткость и модуль Юнга поверхности;
- ✓ Адгезивную силу поверхности.



Зонд может либо колебаться на резонансной частоте, в таком случае действие на него силы будет проявляться в изменении амплитудно-частотных характеристик колебаний (полуконтактный метод), либо подводится к образцу без колебаний, тогда оценивается напрямую изгиб кантилевера по отклонению лазерного пучка (контактный метод).

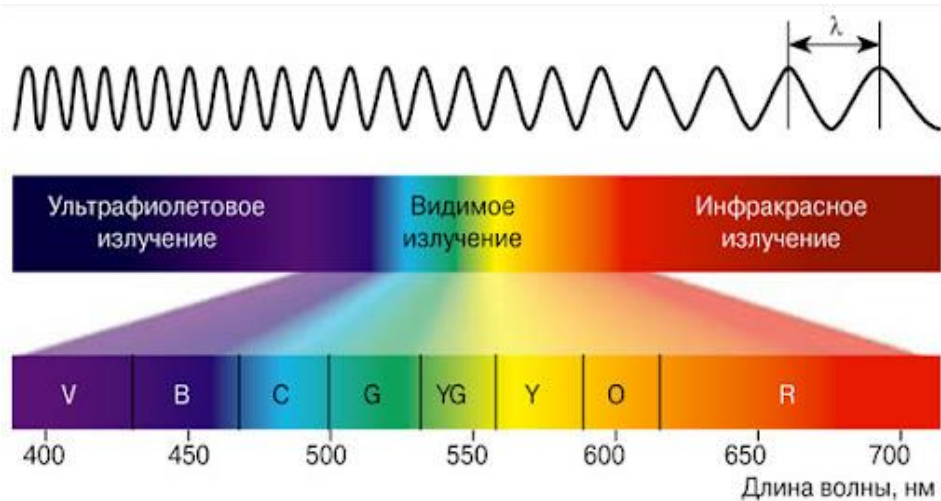
Больше информации: doi.org/10.3390/nano11051154



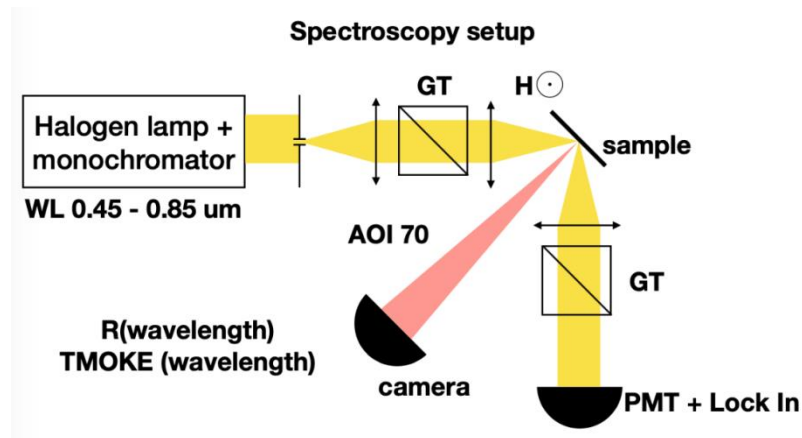
Характеризация материалов:

7. Метод оптической спектроскопии

Оптическая спектроскопия – метод, который позволяет определить спектральные диапазоны поглощения оптического излучения. Положение пиков поглощения связано как с составом исследуемого образца, так и с его геометрическими характеристиками.



Спектральный диапазон оптического излучения с указанием длин волн



Принципиальная схема установки частотно-угловой спектроскопии
(GT – поляризаторы, AOI – угол падения, PMT – фотоумножительная трубка, Lock In – синхронный усилитель)

Больше информации: [doi: 10.1038/s41598-020-63535-1](https://doi.org/10.1038/s41598-020-63535-1)
[doi:10.1016/j.jmmm.2019.03.052](https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.03.052)

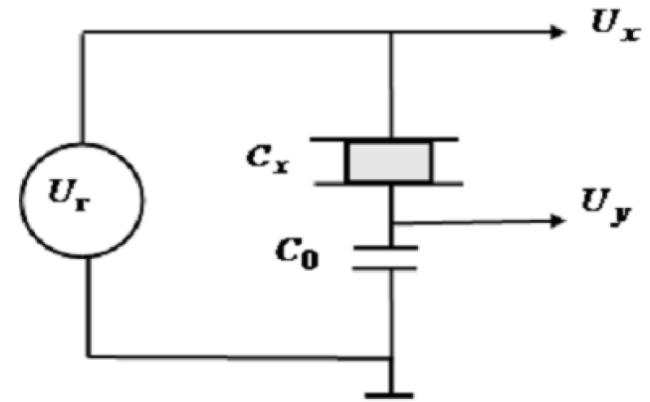


Международная Школа
по Умным Композитным Материалам
для начинающих

8. Измерение сегнетоэлектрических петель гистерезиса

Сегнетоэлектрикам свойственно явление гистерезиса, заключающееся в запаздывании изменения поляризованности P и смещения D при изменении напряженности поля E . При циклических изменениях напряженности поля E зависимость P и смещения D от E выражается кривой, называемой петлей сегнетоэлектрического гистерезиса.

Для измерений петель сегнетоэлектрического гистерезиса используется схема Сойера-Тауэра.



Метод основан на использовании емкостного делителя, у которого в одном плече - конденсатор с исследуемым образцом сегнетоэлектрика C_x , в другом - конденсатор с известной емкостью C_0 . Переменное электрическое поле пропорциональное напряжению U_r создается высоковольтным источником питания. В этом случае U_y - падение напряжения на C_0 прямо пропорционально поляризованности P : $U_y = P \cdot S / C_0$,

где S - площадь обкладок исследуемого сегнетоэлектрика C_x . Напряжение U_x пропорционально напряженности электрического поля E между обкладками конденсатора с сегнетоэлектриком толщиной h : $E = U_x / h$.

Больше информации: doi.org/10.1051/epjconf/201818507008



9. Измерение магнитоэлектрического эффекта

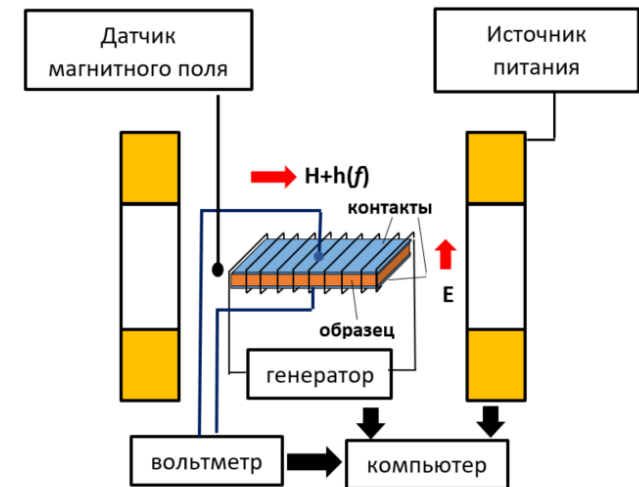
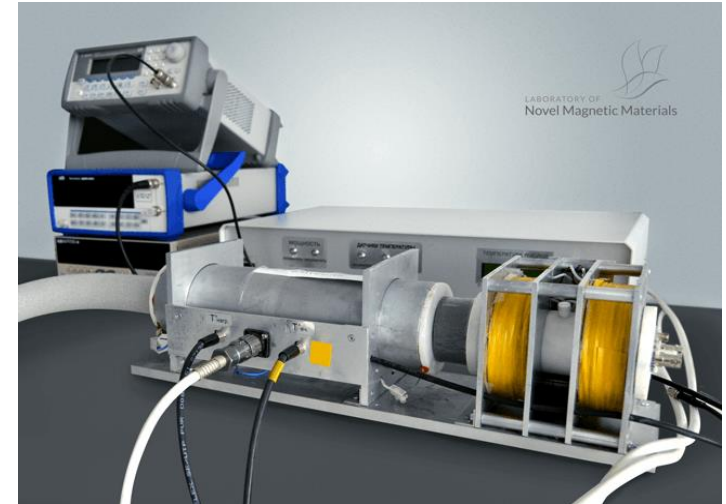
Магнитоэлектрический эффект (МЭ) заключается в изменении поляризации вещества при помещении его в магнитное поле (прямой МЭ эффект), или изменении намагниченности вещества при помещении его в электрическое поле (инверсный или обратный МЭ эффект).

Одним из распространенных подходов в исследовании композитных МЭ материалов является динамический метод измерения МЭ эффекта. Измерение магнитоэлектрического напряжения ΔV на сторонах образца в форме плоского конденсатора толщиной b происходит при помещении его одновременно в переменное модулирующее ΔH и постоянное H_{dc} магнитные поля.

В качестве характеристики магнитоэлектрических свойств используется параметр α_{ME} , называемый магнитоэлектрическим коэффициентом по напряжению, который определяется выражением :

$$\alpha_{ME} = \frac{\Delta E}{\Delta H} = \frac{\Delta V}{b \Delta H}$$

где ΔE - изменение напряженности электрического поля



Больше информации: [doi:10.3390/ma10080963](https://doi.org/10.3390/ma10080963)



10. Подсчет агрегированных наночастиц в полимере при помощи ImageJ

Оптическим методом при помощи микроскопа возможно определить количество агрегированных частиц в полимере. Делается от 3 до 5 фотографий разных участков одного образца. После этого используя программу ImageJ и следуя протоколу можно подсчитать количество агрегированных частиц.

- 1) Открыть сохраненное фото образца в программе in ImageJ
- 2) В верхней панели меню выбрать: Image – RGB stack
- 3) Фото будет разделено на три с различной степенью градации серого
- 4) В верхней панели меню выбрать: Image – Stacks – Make Montage - Ok
- 5) В верхней панели меню выбрать: Image – Adjust – Threshold
- 6) Пометить красным цветом специфичные области, которые нужно посчитать. После того, как отмечены все области – выбрать Set.
- 7) В появившемся окне Set нужно выбрать значения, которые в дальнейшем будут использованы для корректировки и подсчета выделенных областей на фото. Запомните значения, которые были выбраны – для дальнейшего подсчета серии образцов вы должны использовать одни и те же значения. Выбираем - Ok.
- 8)) В верхней панели меню выбрать: Analyze – Set measurements – выбираем и отмечаем следующие позиции:
 - ✓ Area,
 - ✓ Area Fraction,
 - ✓ Limit to threshold,
 - ✓ Display label
 - ✓ Ok
- 9) В верхней панели меню выбрать: Analyze – Measure.
- 10) Результат: % Area.

Sets for adjusting всегда должен быть одинаковым для всего набора образцов!

Больше информации: <https://imagej.nih.gov/ij/>

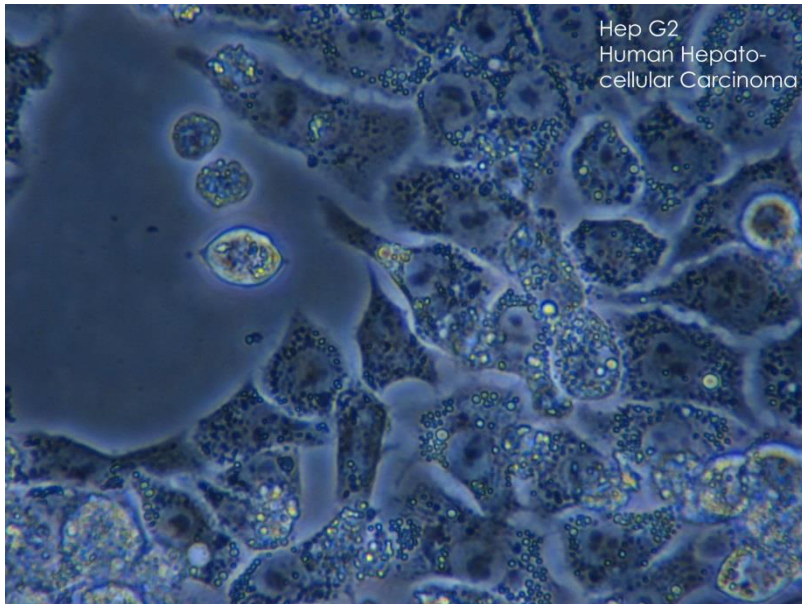


Характеризация биосовместимости материалов:

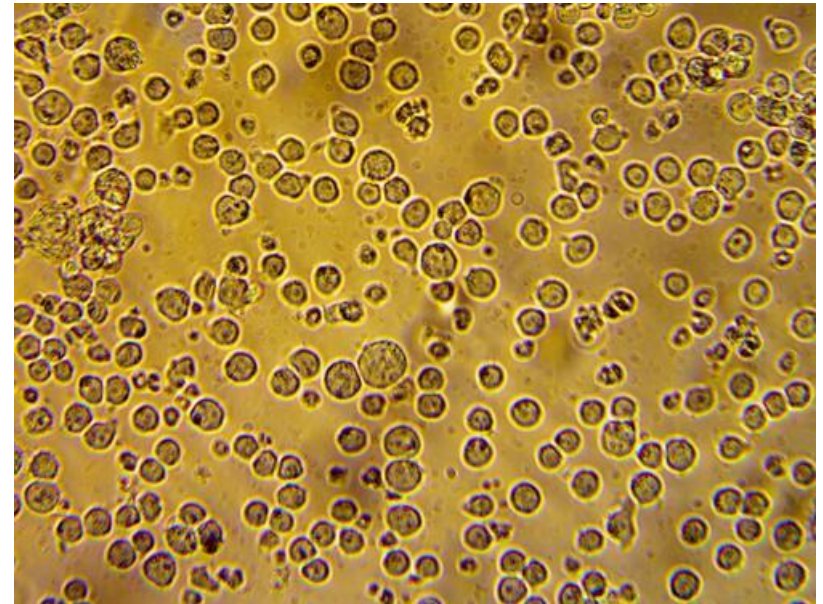
11. Иммуортиализованные клеточные культуры

Иммуортиализованные клеточные культуры – это популяция клеток многоклеточного организма, которые не могут делиться бесконечно в нормальных условиях. Однако, из-за естественных или искусственно созданных мутаций, такие клетки не подвержены клеточному старению и могут продолжать делиться.

Существуют адгезивные и суспензионные клеточные культуры. **Адгезивным клеткам** необходимо прикрепление к поверхности, а **суспензионные** – делятся в толще питательной среды и не требуют прикрепления.



Адгезивная клеточная культура: HepG2
(гепатоцеллюлярная карцинома
печени человека)



Суспензионная клеточная культура: Jurkat
(Т-лимфоциты острой лейкемии человека)

Больше информации: doi.org/10.1016/j.jmmt.2020.167623



Международная Школа
по Умным Композитным Материалам
для начинающих

Характеризация биосовместимости материалов:

12. Пассирование клеточных культур

Пассирование клеточных культур – это разделение клеточной культуры для ее дальнейшего роста и деления. Единичная процедура пассирования клеток называется **пассаж**. Это процедура происходит в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Клетки отбираются в определенном количестве и помещаются в питательную среду с добавлением питательных веществ для их роста и деления (FBS 5%) и антибиотиков (для предотвращения заражения и развития бактерий).



Стерильный ламинарный шкаф для работы с клеточными культурами

CO₂-инкубатор Thermo Scientific

После пассирования клетки помещаются в инкубатор, в котором определенная температура, концентрация газа (CO₂/O₂/N₂) и влажность обеспечивают оптимальные условия для роста и деления клеток.



Больше информации: doi.org/10.3390/nano10091646



Международная Школа
по Умным Композитным Материалам
для начинающих

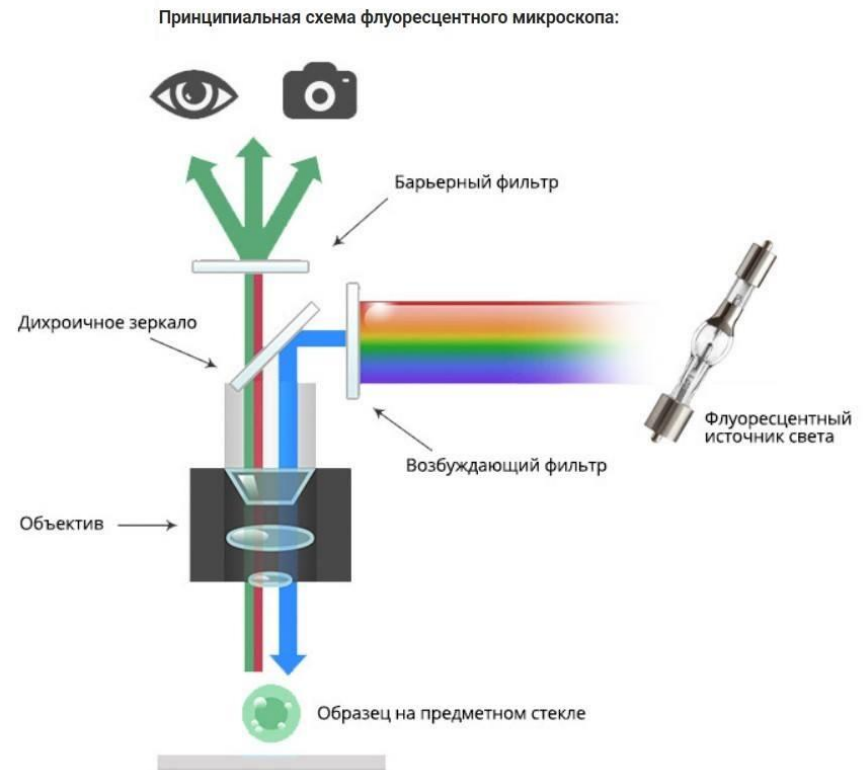
Характеризация биосовместимости материалов:

13. Флуоресцентное окрашивание клеток

При прижизненном **флуоресцентном окрашивании**, клетки инкубируются с раствором флуорофора, который связывается специфическим образом с «белком-интересом».

Флуорофор, возбуждаемый определенной энергией, переизлучает оптические волны в другой спектральной области. Детектирование при помощи флуоресцентной микроскопии позволяет определить концентрацию флуорофора и, как следствие, связанного с ним белка.

Для определенных компартментов клетки используются различные типы флуорофоров.



Больше информации: <https://biocommerce.ru/spravochnik-po-tehnologiyam/kak-deystvuet-fluorestsenny-mikroskop/>



Международная Школа
по Умным Композитным Материалам
для начинающих

Характеризация биосовместимости материалов:

13. Флуоресцентное окрашивание клеток

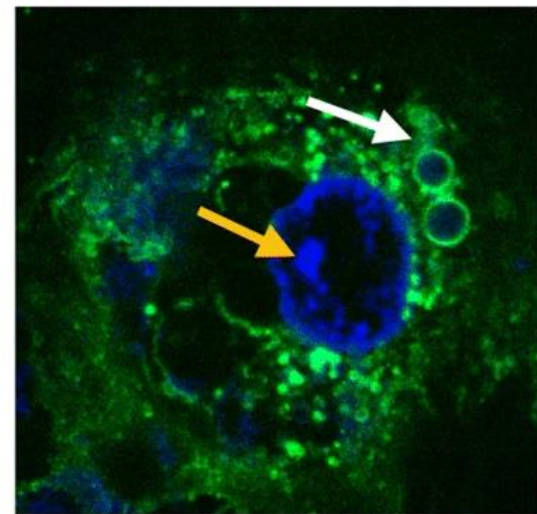
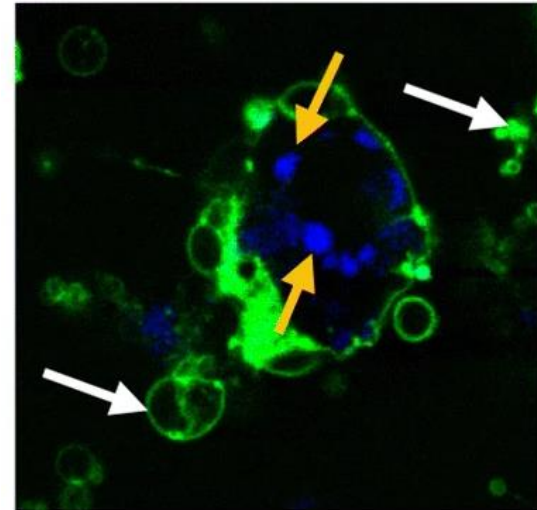
Использование нескольких красителей позволяет осуществлять одновременное окрашивание различных клеточных структур у исследуемого образца.

Таким образом, можно отследить взаимное расположение структур клетки, их форму, состояние клеточного цикла.

На изображении справа отчётливо видны:

- клеточные ядра (окрашенные красителем Hoechst 33342 в синий цвет);
- Annexin V (в зелёный);

Микроскопия позволяет регистрировать флуоресцентные сигналы от интересующих нас объектов и измерять их интенсивность.



Больше информации: DOI: 10.1186/s40580-020-00228-5

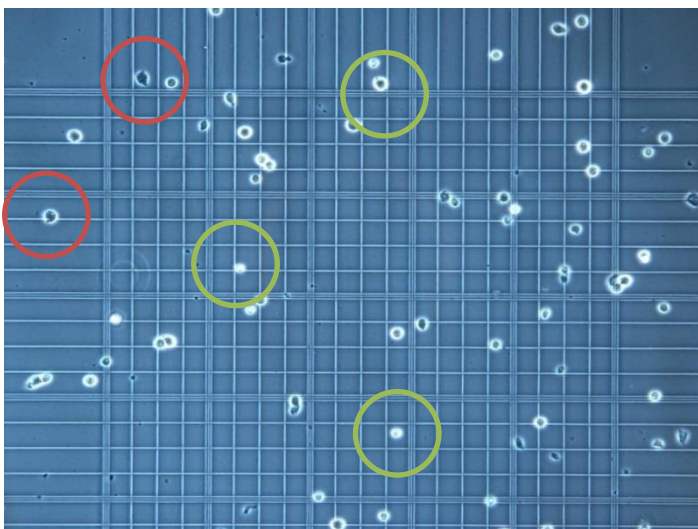


Характеризация биосовместимости материалов:

14. Подсчет клеток при помощи камеры Горяева и Countess II FL

Во время пассивирования и экспериментов важно контролировать жизнеспособность и численность клеток.

Использование красителя Трипанового синего, способного окрашивать только мертвые клетки (при этом клетки окрашиваются в синий цвет). Количество окрашенных клеток позволяет подсчитать процент мертвых клеток и жизнеспособность клеточной культуры.



(А)



(Б)

○ живая клетка ○ мёртвая клетка

Использование камеры Горяева ((А) гемоцитометра) позволяет с помощью микроскопа подсчитать количество клеток в заданном объёме.

Автоматические счётчики клеток, к примеру Countess II FL (Б), автоматизируют и ускоряют процесс.

Больше информации: [/doi.org/10.1016/j.jmmtm.2020.167623](https://doi.org/10.1016/j.jmmtm.2020.167623)

