

Атомно-силова микроскопия: физични основи на метода и един учебен физичен модел

Стефан Кръстев

Abstract: Atomic force microscopy: physical basis of the method and an educational physical model: Taking into consideration the current applications and far-reaching perspectives of atomic force microscopy in biomedical research, this article presents an outline of a laboratory exercise, which includes the physical basis of the method, as well as an educational physical model, which provides a macroscopic-scale demonstration of scanning of object's relief implemented through the measuring of elastic force interaction with the object at a constant height (contact mode).

Key words: atomic force microscopy, physical basis, educational physical model, macroscopic-scale demonstration.

ВЪВЕДЕНИЕ

Атомно-силовата микроскопия е разработена първоначално за изследване на наноразмерни полупроводникови структури, но със своята висока разделителна способност, както във вакуум, така и в газова или течна среда, както и възможност за изследване на фиксирани и живи обекти при физиологични условия, за детайлна им топография и морфология, за изследване структурата на белтъците, както и способността да регистрира взаимодействия със сила от порядъка на 10^{-12} N и т.н., тя бързо навлезе в клетъчните и молекулярни изследвания [3, 4]. Атомно-силовата микроскопия намира особено широко приложение в биомедицинските изследвания, като понастоящем се оформя изцяло ново направление—бионанонаука [7], при което вече става въпрос не само за изследвания на молекулно и атомно ниво, но и за осъществяване на т. нар. нанобиоманипулации [7]. Този изключително прецизен метод за изследване намира приложение в биофизичната химия на клетките [2], дава възможност да се получават изображения на отделни белтъци при физиологични условия, както и пряко наблюдение на техните конформационни изменения [5]. Особено интензивно се развива в последно време приложението на атомно-силовата микроскопия в изследванията на раковите клетки [6], както и ефекта на лекарствени средства върху техните мембрани [8].

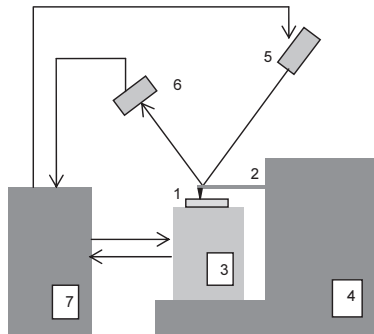
Няма съмнение, че в рамките на следващите години, атомно-силовата микроскопия ще бъде част от рутинните методи на съвременната клинична медицина. Горейзложеното поставя като особено актуален въпросът за включването на тази тема в учебната програма за обучение на студентите по медицина, при което те наред с оптичния и електронния микроскоп, да бъдат запознати с физичния принцип на действие и възможностите на атомно-силовия микроскоп.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Отчитайки актуалността и особената перспективност в прилагането на атомно-силовата микроскопия в биомедицинските изследвания за решаването на този проблем беше разработено лабораторно упражнение за учебната дисциплина „Медицинска физика“ на тема „Атомно-силова микроскопия: физични основи на метода и изследване на демонстрационен макро-физичен модел.“

В началото на лабораторното упражнение на студентите се предлага сравнение на качествата и границите на разделяне на съвременните оптични и електронни микроскопи, както и ограниченията при тяхното използване и специфичните изисквания за подготовка на препаратите за изследване. Отбелязва се, че предшественик на атомно-силовият микроскоп е сканиращият тунелен микроскоп (1982), като сканиращата тунелна микроскопия дава възможност за изследване на повърхностите с невероятната дотогава детайлност, като за този свой принос Бениг и Рорер през 1986 г. са удостоени с Нобелова награда по физика.

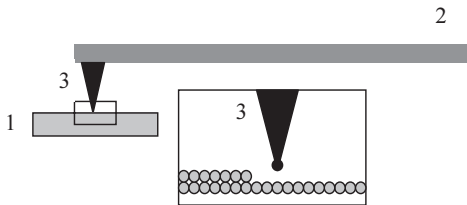
Работещата на основата на тунелния ефект сканираща микроскопия има обаче един съществен недостатък—могат да се изследват само материали, които са добри проводници на електричен ток. Отбелязва се, че през същата тази 1986 г. Биниг прави следващата стъпка: разработва атомно-силов микроскоп [1], който запазвайки високата разделителна способност на сканиращия тунелен микроскоп, премахва ограниченията, свързани с него.



Фигура 1. Принцилна схема на атомно-силов микроскоп

Разглежда се принципната схема на атомно-силов микроскоп (Фигура 1.). При обект за изследване (1), основните части на един атомно-силов микроскоп са: кантилевер (2); скенер (3); основа (4); система детектираща движението на кантилевера (5 и 6); електронен блок за управление, регистрация, обработка и изобразяване на получените резултати (7).

Кантилеверът (2) с неговата игла (сонда) е основен елемент на атомно-силовият микроскоп. Кантилеверите се различават по своята форма и вид на сонда,



Фигура 2. Принцилна схема на системата: обект(1)—кантилевер(2)—сонда(3). Вдясно са дадени в увеличен вид обекта и за удобство само един атом на върха на сондата.

техният материал, по броя отделни кантилевери, монтирани на един чип, както и по вида на покритието си. Повечето кантилевери са с форма на паралелепипед и са изработени от монокристал силиций или от силициев нитрид. При размери обикновено: дължина 100 — 500 μm ; ширина 30 — 50 μm и дебелина 0,5 — 8 μm , кантилеверите се монтират върху чипове със стандартен дизайн и размери, съвместими с атомно-силовите микроскопи на повечето производители. Константата на еластичност на кантилевера е между 0,06 и 50 N/m и зависи от прилагания

режим на сканиране.

Сондата (3) на Фигура 2, разположена на свободния край на кантилевера (2), е изработена обикновено от силиций или диамант и е с пирамидална или приблизително конусовидна форма с височина от порядъка на 3 μm и много фин връх (с атомни размери). В резултат на експлоатацията върхът на сондата постепенно се разрушава, което води до намаляване на разделителната способност, в крайна сметка до влошаване на качеството на изображението и до необходимостта от подмяната на кантилевера. Именно, доколкото кантилеверите се

явяват консуматив за атомно-силовия микроскоп, те се изработват върху съответните стандартизирани чипове с макроскопски размери (монтират се и демонтират с помощта на пинцети). За подобряване на отражението на лазерния лъч в процеса на измерване, кантилеверите обикновено имат покритие от алуминий, злато или платина. Значително повишаване на скоростта на сканиране се получава при използването на чипове с два и повече на брой кантилевери с еднакви или различни характеристики.

Прецизното позициониране върху обекта се осъществява чрез скенер, като обикновено кантилеверът е неподвижно закрепен към основата (4), а изследвания образец прецизно се премества от скенер (3). Поради изискването за висока точност на преместване по трите оси, своята относително проста конструкция и висока стабилност, широко разпространение са получили цилиндричните пиезокерамичните скенери. Външната цилиндрична повърхност на тези скенери е покрита от четири отделни електрода, като имат също така и един вътрешен електрод. Прилагането върху тези електроди на подходящи по големина и знак напрежения води до съответните деформации и необходимите премествания на изследвания образец по отношение на сондата, т.е. сканиране на образца. Сканираната площ обикновено е от порядъка на не повече от $150\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$, а по височина — до няколко μm , поради което съществува класическа микрометрична механична система за подбиране на необходимия за сканиране участък от изследвания обект.

Детектиращата движение на кантилевера система обикновено е от оптичен тип (Фигура 1.) и се основава на отражението на излъчен от миниатюрен лазер (5) лъч, който отразявайки се от горната повърхност на кантилевера попада върху фотодиодна матрица (6). Измерените фототокове дават възможност да бъде отчитано положението на кантилевера, респективно на неговата сонда, във всеки определен момент от времето.

В крайна сметка електронният блок за управление, регистрация, обработка и изобразяване на получените резултати (7) на Фигура 1, е този, който подsigурява цялостната синхронизация и реализация на процеса на наблюдение от задаването на параметрите на изследването до визуализацията на резултатите от самото наблюдение. Чрез него се задава режимът на сканиране, и размерите на площадката за сканиране, както и стъпката на сканиране по всяка от осите, генерират се и се подават синхронизирано подходящите напрежения на скенера, обработват се резултатите от детектиращата система за положението на кантилевера и т.н. Естествено всичко това се осъществява от компютърна система със съответния специализиран софтуер. Съществуват различни алгоритми за обработка и изглаждане на неизбежните в процеса на сканиране изкривявания, топлинни изменения в изследвания образец, нелинейност на пиезокерамичния скенер и др.

Основата (4) на Фигура 1 е носещата конструкция на атомно-силовия микроскоп и осигурява неподвижното закрепване на останалите компоненти. За да се намалят до възможният минимум външните шумове в резултат на вибрации на сградата или в помещението, основата се монтира обикновено върху фундамент с подходяща амортизационна подложка/ки. В някои модели за намаляване на тези външни шумове цялата измерителна система е окачена на еластични връзки и виси над масивна основа (4).

Принципът на действие на атомно-силовия микроскоп е изключително прост — над образца за изследване е разположена еластична пластина (кантилевер), закрепена неподвижно в единия си край към основата, по отклонението на която може да се отчита еластичната силата на взаимодействие на сондата с изследвания образец. Образецът е разположен на скенер, който може да премества образца с определена стъпка в три взаимно перпендикулярни направления. При приближаване на сондата към образца, в зависимост от това доколко малко е разстоянието между

тях, ще действат сили на привличане или на отблъскване, като в първия случай атомно-силовия микроскоп ще работи в т. нар. режим на контактно сканиране, а при втория — безконтактно сканиране.

Наименованието „контактен режим на сканиране“ е свързано с това, че сондата преминава на толкова малко разстояние от образеца, че практически има физичен контакт. Възникващата при това сила на отблъскване се уравновесява от еластичната сила на кантилевера. От това следва, че константата на еластичността на кантилевера трябва да бъде достатъчно малка, за да може сондата да „проследява“ повърхността без да я разрушава. Релефът на изследваната повърхност се формира по два основни начина: режим на постоянна височина (измерва се отклонението на кантилевера във всяка точка при хоризонталното му движение над образеца), или в режим на постоянна сила (с използването на обратни връзки се поддържа постоянна по големина сила на взаимодействие на сондата с образеца).

При безконтактният режим на сканиране действат Ван-дер-Ваалсовите сили на привличане. За да се възпрепятства „слепването“ на сондата с образеца в този режим е необходимо константата на еластичност на кантилевера да бъде голяма, което налага използването на по-чувствителна система за детектиране на вертикалното му преместване.

В режим на периодичен контакт, т.нар. *tapping mode*, сканирането се осъществява с използването на още един пиезокерамичен манипулатор, предизвикващ принудени механични трептения на кантилевера с честота близка до резонансната му и с амплитуда от порядъка на 100 нм. При този режим в хода на сканирането се регистрира изменението на амплитудата на кантилевера, която от своя страна е свързана с големината на приложената външна сила.

Независимо, че под взаимодействие обикновено се разбира отблъскване или привличане между сондата и образеца под действие силите на Ван-дер Ваалс, понастоящем съществуват редица модификации на атомно-силова микроскопия за анализа на други видове взаимодействия, например сили на триене, електрични сили, магнитни сили и т.н.).

Разработеният макро-физичен модел е оформен като непрозрачен корпус, във вътрешността на който е разположен 3-мерен обект с неизвестен релеф, като съществува възможност такива обекти лесно и удобно да бъдат заменени. В експерименталната част на упражнението сканирането се осъществява с постоянна стъпка по осите x и y , като за целта в горния панел на корпуса са направени водещи вертикални отвори за измерителят на сила, отчитащ еластичното взаимодействие на неговата сонда с повърхността на изследвания обект при постоянна височина на сканиране (т.е симулира се „контактен режим на сканиране“). Измерителят на сила е реализиран на базата на тензOMETричен датчик с чувствителност от порядъка на милиньотони, като резултатите от измерването се визуализират на течно-кристален дисплей. Измерителят на сила се премества по повърхността на горния панел, като студентите последователно правят измервания за силата на еластично взаимодействие на сондата с неизвестния за тях обект във всяка точка от матрица 20×20 елемента. Получените при измерванията резултати могат да се представят в Excel-форма, изобразяват се графично в тримерна координатна система, като по този начин се получава изображение на релефа на изследвания обект. В процес на разработване е прототип със значително по-голяма матрица, респ. по-висока разделителна способност, както и с директна връзка с компютъра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предварителните тестове показват, че студентите проявяват голям интерес към темата атомно-силова микроскопия и нейното приложение за целите на биомедицинските изследвания, както и към макро-физичния модел, демонстриращ

принципа на неговата работа. Лабораторното упражнение е подготвено за студентите от специалност „медицина“, но би могло да се въведе в учебната програма и на други медицински специалности.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Binning, G., Quate C. F., Gerber, CH.: Atomic force microscopy, *Phys. Rev. Lett.* **56**(9),(1986):930–933.

[2] Deng Zhao, Valentin Lulevich, Fu-tong Liu and Gang-yu Liu: Applications of Atomic Force Microscopy in Biophysical Chemistry of Cells, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114** (18):5971–5982, DOI: 10.1021/jp9114546.

[3] Francis LW, Lewis PD, Wright CJ, Conlan RS: Atomic force microscopy comes of age, *Biol Cell.*, 2009, **102**(2):133–43.

[4] Min Y, Kristiansen K, Boggs J M, Husted C, Zasadzinski J A, and Israelachvili J: Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(9):3155—3159.

[5] Scheuring S, Fotiadis D, Möller C, Müller SA, Engel A and Müller DJ: Single Proteins Observed by Atomic Force Microscopy, *Single Mol.* **2** (2001) 2, 59-67.

[6] Sokolov I, Atomic force microscopy in cancer cell research, Chapter 1, pp. 1—17, in: *Cancer nanotechnology*, Nalwa HS and Webster T eds., American Scientific Publishers, 2007, 380 pages.

[7] Yang R, Xi N, Fung CKM, Seiffert-Sinha K, Lai KWC, Sinha AA: The Emergence of AFM Applications to Cell Biology: How new technologies are facilitating investigation of human cells in health and disease at the, *Journal of Nanoscience Letters*, Volume **1**, Issue 2 (2011):87-101.

[8] Wang J, Wan Z, Liu W, Li L, Ren L, Wang X: Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs, *Biosensors and Bioelectronics*, **25** (2009):721–727.

За контакти:

гл. ас. Стефан М. Кръстев, дбф, Катедра “Физика и биофизика”, Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“—Варна, тел. 052 623337, e-mail: krustev@mu-varna.bg

Докладът е рецензиран.