

РАДИОЭЛЕКТРОНИКА И ПРИБОРОСТРОЕНИЕ

УДК 53.08

МОХАММЕД САЛЕМ А. А.¹, Е. С. ДРОЗД^{2,3}, С. А. ЧИЖИК²

ВЛИЯНИЕ НАГРУЗКИ В КОНТАКТЕ ЗОНД – ОБРАЗЕЦ НА КАЧЕСТВО ИЗОБРАЖЕНИЙ В ПОЛУКОНТАКТНОМ ДИНАМИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ Белорусский национальный технический университет,

² Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси,

³ Генуэзский университет

(Поступила в редакцию 25.07.2014)

Введение. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет исследовать поверхность непроводящего образца с высоким разрешением. Кроме того, атомно-силовой микроскоп можно эффективно использовать для измерения механических свойств образца в наномасштабе [1–4]. При этом роль наноиндентора выполняет острое зонда.

АСМ относят к перспективным методам визуализации биологических микрообъектов. Среди преимуществ метода – возможность исследования объекта без его разрушения или повреждения, получение истинно трехмерного рельефа поверхности без сложной подготовки образца. Ранее было показано, что, используя метод наноиндентирования, возможно составить карту жесткости биологической клетки (томография жесткости) [5]. Послойное сканирование методом АСМ в динамическом режиме дает множество изображений, содержащих информацию о внутренней структуре объекта. При их должной математической обработке также возможно получение трехмерной карты механических свойств (томографии) исследуемого объекта. Осуществляется подобное сканирование при различных значениях прикладываемой нагрузки.

Кроме того, в поисках новых возможностей изучения субклеточных и молекулярных процессов в последнее десятилетие стали все чаще использовать различные методы микроскопии в сочетании друг с другом. В связи с этим появился термин «корреляционная микроскопия» [6].

На качество изображения, разрешение объекта, получаемое в АСМ, влияют ряд факторов. Среди них форма и чистота поверхности наконечника зонда, тепловой дрейф, ползучесть и гистерезис, характерные для пьезоэлектрической керамики сканера. Экспериментальные результаты [7] показали, что скорость сканирования и качество изображения АСМ могут быть значительно улучшены за счет уменьшения добротности микрокантилевера зонда. Ухудшает качество изображения и увеличивает погрешность измерений затупление наконечника зонда из-за его износа в процессе многократных измерений [8]. В результате обработки изображений, получаемых при морфометрии поверхности образца методом АСМ, возможно возникновение различных артефактов. Для их устранения применяются специальные математические методы [9]. Обзор математических методов улучшения и реконструкции этих изображений приводится, например, в [10, 11].

Цель данной работы – визуализация поверхности полимерных материалов и биологических клеток путем неразрушающего микромеханического воздействия, определение оптимальной нагрузки для получения качественных изображений топографии и фазового контраста в динамическом режиме измерений АСМ.

Материалы и методы исследования. Визуализацию структуры поверхности полимера поливинилпиридина (ПВП) с наночастицами кремния SiO₂ и раковых клеток линии A549 проводи-

ли при помощи атомно-силового микроскопа NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Объекты исследовали на воздухе в динамическом режиме стандартными зондами («MikroMasch» Co., Эстония). При исследовании полимерного материала использовали микрозонды, характеризующиеся следующими параметрами: резонансная частота f_0 , радиус острия зонда R_r , жесткость кантилевера k (таблица).

Характеристики зондов

№ зонда	Тип	R_r , нм	f_0 , Гц	k , Н/м
1	NSC11	24,7	55831	2,60
2	NSC11	23,7	360820	57,38
3	NSC21	20,2	156748	9,75
4	NSC35	23,9	273359	10,54

Величина максимальной нагрузки F_{\max} задается степенью подавления исходной амплитуды колебаний кантилевера зонда при контакте острия с образцом (R_{sp}). Значение R_{sp} , равное 100%, соответствует амплитуде свободных колебаний, т. е. отсутствию взаимодействия зонда и исследуемого образца. В случае $R_{sp} = 0\%$ имеет место полное подавление колебаний кантилевера (максимальная нагрузка). Для определения величины относительной нагрузки, при которой получается наиболее качественное изображение, измерения осуществлялись в полуконтактном динамическом режиме при $R_{sp} = 15\text{--}80\%$, т. е. в диапазоне относительных нагрузок 20–85%.

Результаты исследования. Изображения топографии и фазового контраста получали при одной величине относительной нагрузки в процессе сканирования одновременно в пределах исследуемого участка образца. При повторном сканировании с другой величиной относительной нагрузки возможно небольшое смещение зонда. По этой причине имеет место также небольшое смещение наблюдаемых на изображении особенностей, обнаруживаемое как на рис. 1, а, б, так и на некоторых других рисунках данной статьи.

Получено, что наиболее качественные изображения топографии и фазового контраста того же участка поверхности реализовались при различных значениях нагрузки. Здесь приведены наилучшие по качеству изображения топографии и фазового контраста. При использовании зонда № 1 (таблица) наиболее качественные изображения топографии и фазы получены на относительных нагрузках 40 и 60% соответственно (рис. 1).

Объединенные в кластер три сферические наночастицы на изображении фазового контраста (рис. 1, б) различаются гораздо хуже, чем на изображении топографии поверхности ПВП (рис. 1, а). При этом на изображении фазового контраста более отчетливо проявляются другие элементы структуры полимера на том же участке поверхности.

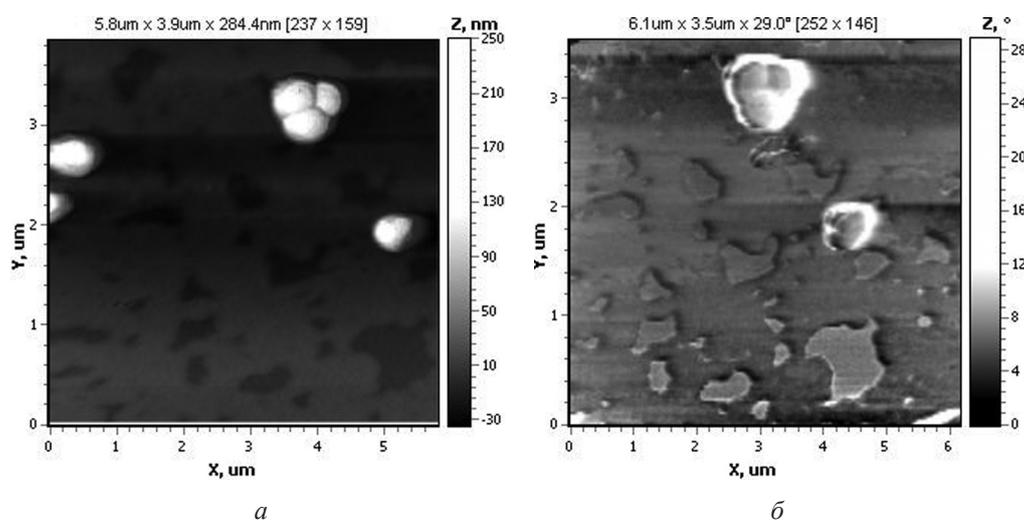


Рис. 1. Изображение топографии ПВП и фазового контраста при относительной нагрузке 40 % (а) и 60% (б)

При использовании зонда № 2 получены качественные изображения топографии и фазы при нагрузках 45 и 30% соответственно (рис. 2, *a, б*). Здесь изображения наночастиц имеют вытянутую форму, изображение фазового контраста лучше передает структуру поверхности ПВП. Вытянутость наночастиц в направлении сканирования свидетельствует об их смещении по поверхности во время сканирования.

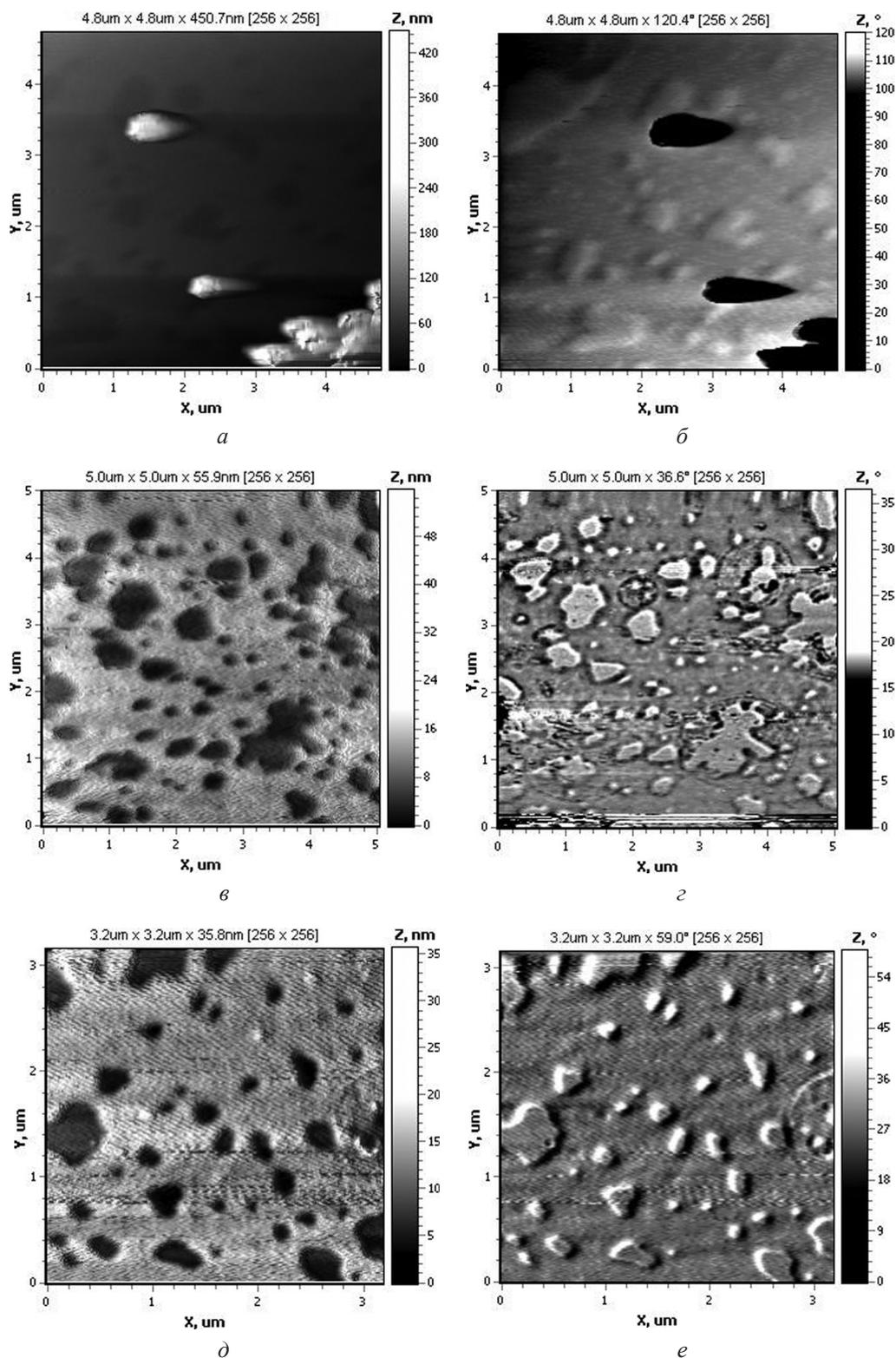


Рис. 2. Топография ПВП (*a, в, д*) и фазовый контраст (*б, г, е*) при относительных нагрузках: *a, в, д* – 45, 45, 50 % соответственно; *б, г, е* – 30, 35, 50 % соответственно

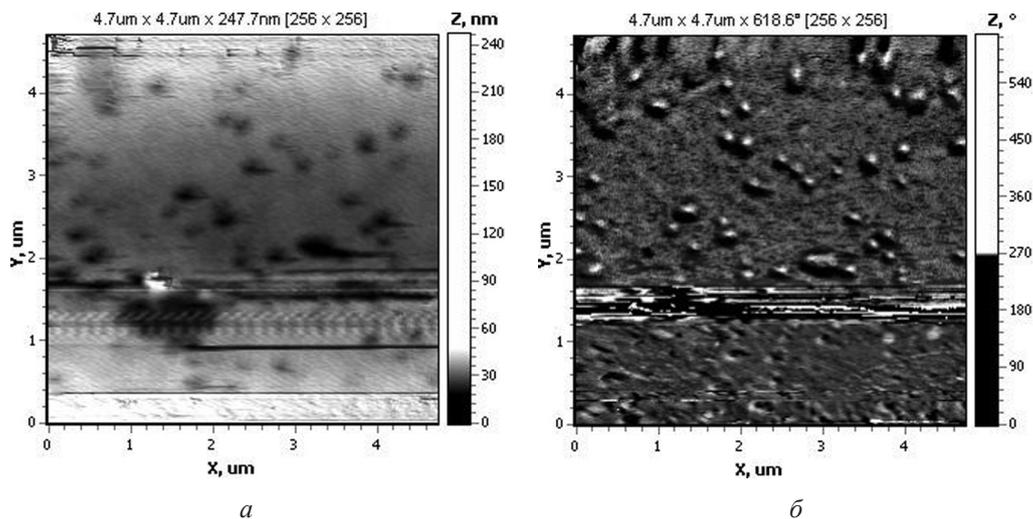


Рис. 3. Топография ПВП и фазовый контраст при относительных нагрузках 40 % (а) и 30 % (б)

Следует отметить, что и в случае измерений с использованием зондов № 3 и № 4 при оптимальной нагрузке (рис.2, в–е) качество изображений фазового контраста существенно выше, чем изображений топографии.

Случай неудачного выбора величины нагрузки, при которой часть поверхности ПВП оказывается в сильном контакте с зондом № 3, демонстрирует рис. 3. При этом возможны повреждение поверхности образца или загрязнение острия зонда. В результате получается некачественное изображение как топографии, так и фазового контраста.

На рис. 4 представлены качественные изображения топографии и фазового контраста поверхности раковых клеток линии A549 при нагрузках, меньших порога повреждаемости клеток (а, б), а также изображения с искажениями в случаях превышения этого порога (в).

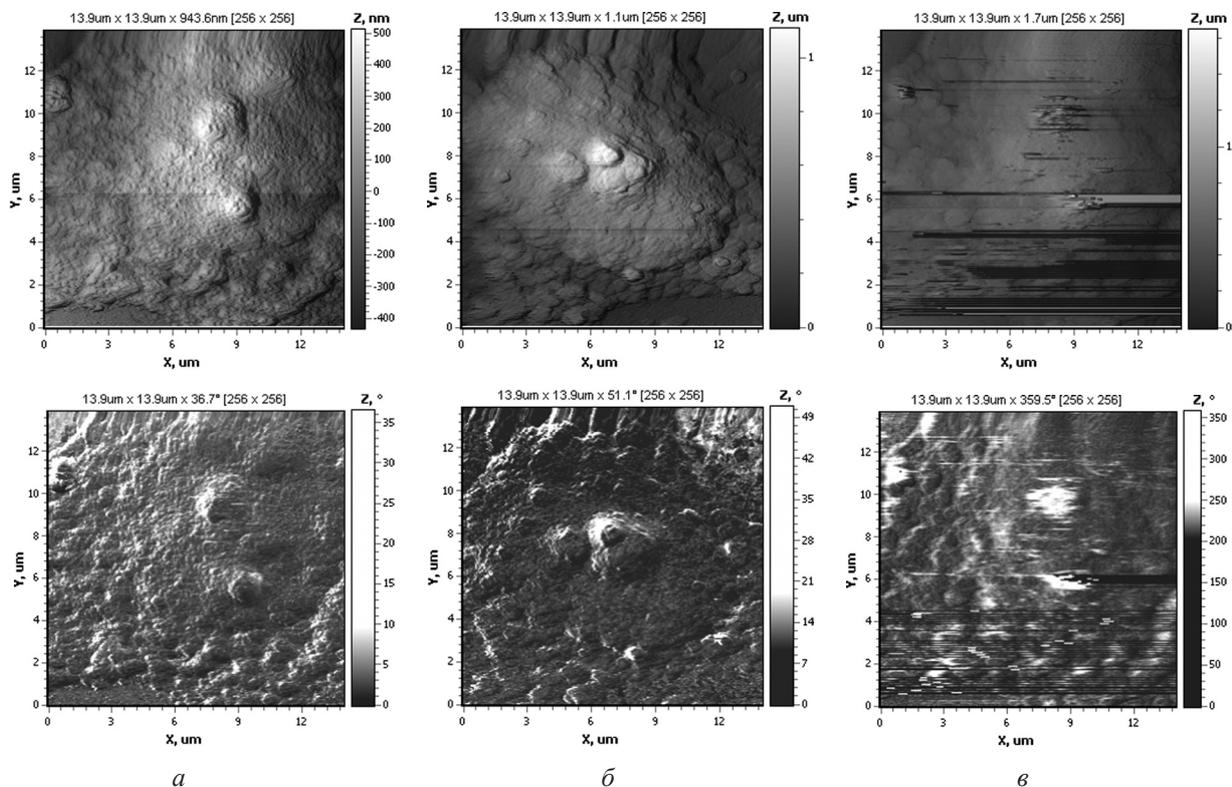


Рис. 4. Топография поверхности клеток и фазовый контраст при относительных нагрузках 60 % (а), 65 % (б) и 85 % (в)

В результате исследований обнаружено, что при относительных нагрузках 60–85% зонд может в значительной степени деформировать поверхность клетки. При этом существенно снижаются качество изображений топографии и фазового контраста. Выбор оптимальной нагрузки зависит как от характеристик зонда (в частности, жесткости кантилевера), так и от высоты неоднородностей на поверхности исследуемых клеток.

Заключение. Выполненное исследование влияния величины нагрузки на качество изображения ПВП с наночастицами показало, что для различных зондов существуют определенные оптимальные нагрузки, при которых получают изображения наиболее высокого качества и разрешения структуры материала. Величина оптимальной относительной нагрузки для визуализации поверхности раковых клеток линии A549 составляет 40–60%. Верхняя граница величины нагрузки для визуализации поверхности клетки в полуконтактном динамическом режиме достигает 60–85%. При более высоких нагрузках происходит значительная деформация исследуемого биологического объекта и возможно проникновение зонда в исследуемую поверхность. При этом существенно снижается качество получаемых изображений топографии и фазового контраста поверхности.

Литература

1. Tao N. J., Lindsay S. M., Lees S. // *Biophys. J.* 1992. Vol. 63. P. 1165–1169.
2. Weisenhorn A., Khorsandi M., Kasas S. et al. // *Nanotechnology.* 1993. Vol. 4. P. 106–113.
3. A-Hassan E., Heinz W. F., Antonik M. D. et al. // *Biophys. J.* 1998. Vol. 74. P. 1564–1578.
4. Matzke R., Jacobson K., Radmacher M. // *Nat. Cell Biol.* 2001. Vol. 3. P. 607–610.
5. Morgenthaler F. D., Knott G. W., Floyd Sarria J. C. et al. // *Eur. J. Neurosci.* 2003. Vol. 17. P. 1365–1374.
6. Lim C. T., Dao M., Suresh S. et al. // *Acta Mater.* 2004. Vol. 5. P. 4065–4066.
7. Karvinen K. S., Moheimani S. O. R. // *Ultramicroscopy.* 2014. Vol. 137. P. 66–71.
8. Fairbairn M. W., Moheimani S. O. R., Fleming A. J. // *Australian Control Conference (AUCC)*, 2011. P. 26–31.
9. Bo Xue, Yongda Yan, Zhenjiang Hu, Xuesen Zhao // *The Journal of Scanning Microscopies.* 2014. Vol. 36, issue 2. P. 263–269.
10. Raposo M., Ferreira Q., Ribeiro P. A. In: *Modern Research and Education Topics in Microscopy.* A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.). FORMATEX 2007. P. 758–769.
11. Chen A., Bertozzi A. L., Ashby P. D. et al. *Enhancement and Recovery in Atomic Force Microscopy Images in Excursions in Harmonic Analysis*, Vol. 2, Andrews T. D., Balan R., Benedetto J. J., Czaja W., Okoudjou K. A. (Eds.), Birkhauser Basel. 2013. P. 311–332.

MOHAMMED SALEM A. A., E. S. DROZD, S. A. CHIZHIK

AN INFLUENCE OF LOADING IN THE PROBE-SAMPLE CONTACT ON THE IMAGE QUALITY OF ATOMIC FORCE MICROSCOPES AT SEMI-CONTACT MODE

Summary

The results of the effect of relative loading on the quality of images of cancer cells and polymer material, obtained with atomic force microscopy in the dynamic tapping mode are described. It is shown that there are optimal loads for different probes, which produce images of the highest quality. The estimation of the loads are made.