

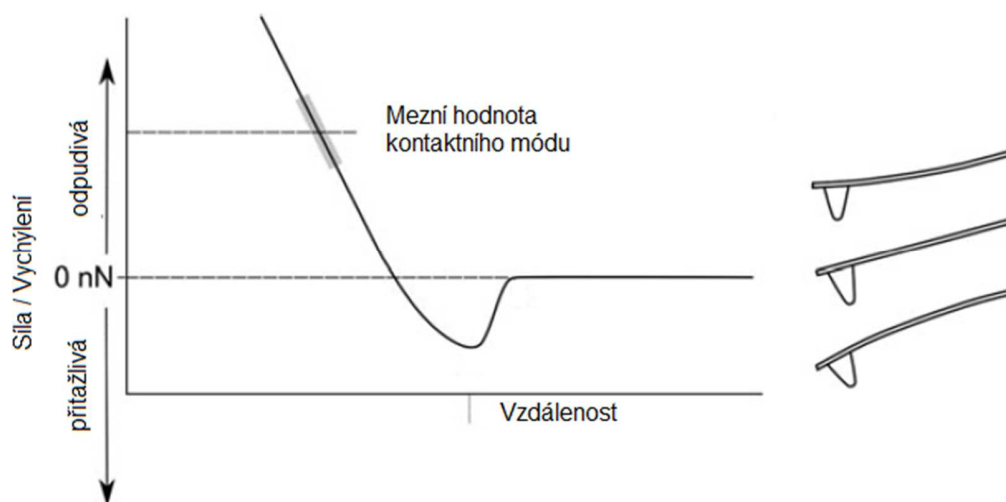
Mikroskopie atomárních sil – úvod

Klasická mikroskopie je při zobrazování velmi malých vzorků omezena tzv. difrakční podmínkou, danou vlnovou délkou použitého vlnění, která se pro viditelné světlo prakticky nedá snížit pod 200 nm. V řadě aplikací – např. materiálové vědy a biologie – chceme ale dosáhnout rozlišení lepšího. Historicky se k tomu vyvíjeli různá řešení. Jednou možností je vylepšování rozlišovací schopnosti optických mikroskopů (např. využitím fluorescenčních technik). Jiným vyvinutým přístupem jsou mikroskopy využívající elektronů místo fotonů. Na elektron lze koukat v tomto kontextu jako na vlnění, oproti fotonu má výrazně kratší vlnovou délku a tedy i nižší difrakční limit. Velkou nevýhodou těchto metod je nutnost poměrně složitých příprav vzorku (fixace, řezání, fluorescenční barvení) nebo náročného experimentálního prostředí (např. vakuová atmosféra).

Zásadně jiného přístupu využívá mikroskopie atomárních sil (*atomic force microscopy* – AFM). Tato metoda se vyvíjela a v 70. a 80. letech 20. století. Jejím základním principem je využívání velmi ostrého hrotu, který je v kontaktu se vzorkem. Tento mechanický přístup k měření odstraňuje řadu limitací – je možné měřit v normální vzdušné atmosféře, vzorek není třeba barvit a může být ponořen i v roztoku (např. buňky v médiu). Na druhou stranu je do určité míry omezen na studium povrchu vzorku.

AFM umožňuje celou řadu aplikací a způsobů měření. Pro lepší pochopení začneme popisem základního přístupu k měření tzv. kontaktního módu. Principy použité v něm se dále objevují v prakticky všech ostatních metodách.

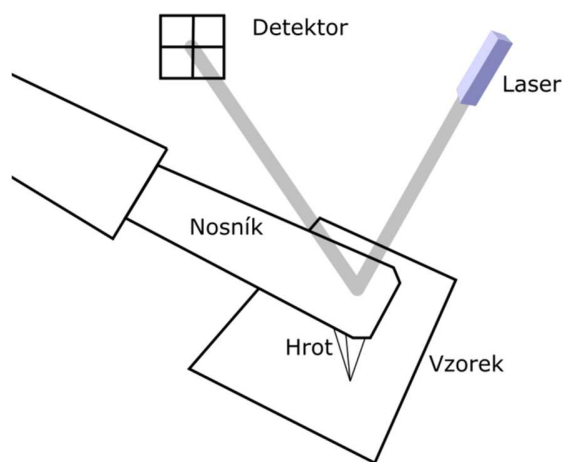
Nejprve je potřeba se věnovat samotné interakci hrotu s povrchem, protože na mikroskopické úrovni děje probíhají trochu jinak, než jak intuitivně chápeme na makroskopické úrovni. Hrot, který má mnohdy samotnou špičku velkou jen desítky nanometrů, je nejprve vysoko nad vzorkem a mezi hrotem a povrchem nepůsobí žádné síly. Když se hrot začne k povrchu přibližovat, dostane se do oblasti, kdy je ke vzorku **přitahován**. Jak se ale přibližuje dále, převládnu repulzivní síly a vzorek je odpuzován. Průběh těchto sil je možné vidět na obrázku 1. Výslednou sílu mezi hrotem a vzorkem vytváří kombinace více typů sil. Uplatňuje se mechanická kontaktní síla, van der Waalovy síly, u vzorků v roztoku pak i kapilární síly. Podle použité sondy se může uplatňovat elektrostatická, magnetická síla a chemické vazby.



Obrázek 1: Schematické znázornění závislosti působící síly mezi hrotem a vzorkem na jejich vzdálenosti, upraveno dle (Eaton & West, 2010)

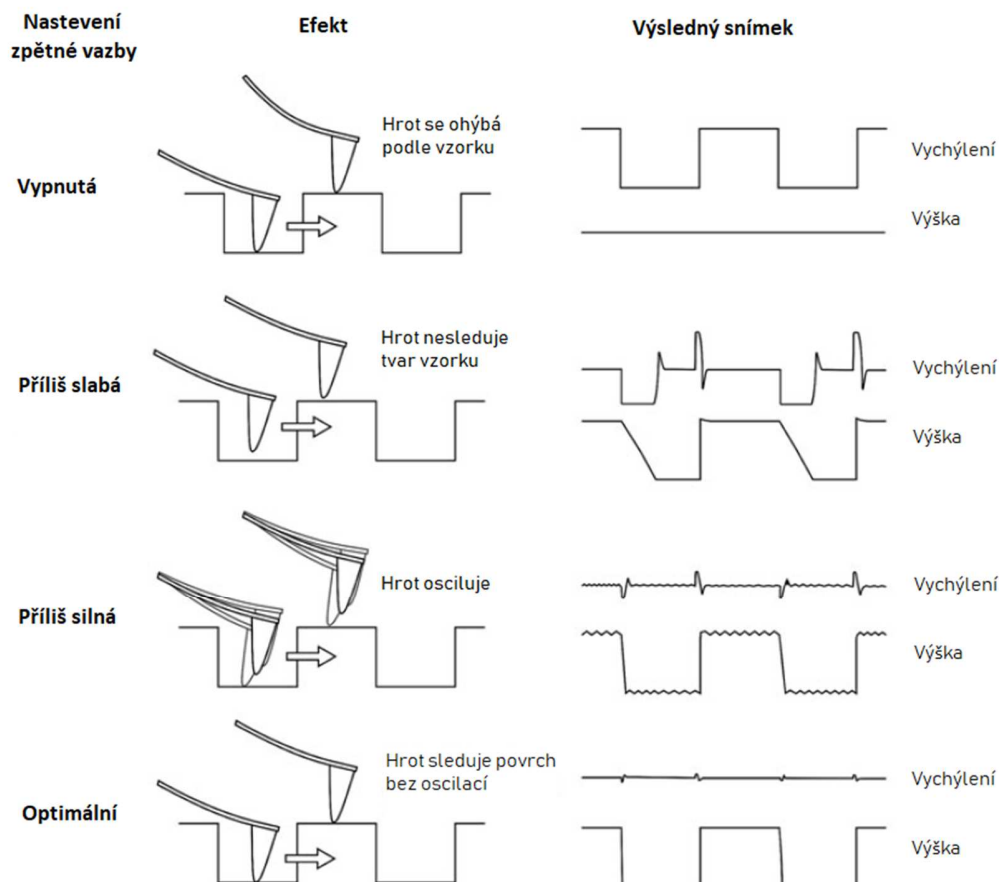
V kontaktním módu využíváme této závislosti. Při měření v kontaktním projíždí hrot nad vzorkem a elektronika udržuje konstantní sílu mezi hrotem a vzorkem a tím i (prakticky) konstantní výšku nad povrchem vzorku. Tato hodnota je zaznamenávána a vzniká tak mapa povrchu vzorku.

Aby toto bylo možné provádět, je potřeba zajistit dvě důležité věci. Jednak velmi jemné ovládání pohybu hrotu o což se starají piezoposuvy. Jednak přesné měření síly mezi vzorkem a hrotem, která se pohybuje v nN. K tomu se využívá principu optické páky/vahadla (*optical lever*). Schéma znázorňující princip tohoto přístupu je na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma principu měření síly mezi hrotem a vzorkem

Hrot je uložen na tzv. nosníku/kantilevru (*cantilever*) a uchycen v hlavě mikroskopu která zajišťuje jeho pohyb. Změnou síly dochází k jeho deformaci. Na vrchní stranu kantilevru dopadá laserový svazek a odráží se na detektor. I nepatrná změna úhlu plochy na který dopadá svazek, vyvolá na poměrně dlouhé optické dráze dostatečně silné vychýlení, které jsme schopni detekovat. Detektor tvoří pole čtyř diod, jak se svazek po poli posouvá, mění se intenzita signálu na jednotlivých diodách a je tak možné změřit vychýlení a vypočítat sílu. Při odchýlení síly od nastavené udržované hodnoty je zpětnovazebně upravována vzdálenost. Nutnost převodu změny vzdálenosti na základě zpětné vazby, nicméně zakládá určité experimentální obtíže. Příliš agresivně nastavená zpětná vazba vede k oscilacím systému. Naopak příliš slabě nastavená zpětná vazba vede k tomu, že hrot dostatečně přesně nekopíruje povrch vzorku a dochází k velkým vychýlením a silám. Různé příklady nastavení zpětné vazby jsou znázorněné na obrázku 3.



Obrázek 3: Znázornění chování kantilevru s hrotem při různých nastavení síly zpětné vazby u AFM. Upraveno dle (Eaton & West, 2010, str. 94).

Druhým základním módem k zobrazování povrchu je tzv. oscilační mód. Ten využívá spíše oblasti přitažlivých sil. Kantilever s hrotem má vlastní oscilační frekvenci a přístroj je rozkmitává signálem blízko této frekvence. Když se hrot přiblíží ke vzorku a dostane se do pole silové interakce, dochází vlivem působení síly ke změně parametrů oscilace (amplitudy, fáze, frekvence). Přístroj opět udržuje konstantní parametry oscilace a tak vzdálenost od vzorku. Výhodou tohoto módu je jemnější interakce mezi vzorkem a hrotem (hrot je spíše v oblasti přitažlivých sil). Je proto vhodný na citlivější a měkčí materiály jako biologické membrány a buňky.

V názvosloví jednotlivých módů existuje mnoho různých názvů pro podobné nebo stejné módy v závislosti na typu přístroje. Např. různé oscilační módy se nazývají například *intermittent contact*, *tapping mode*, *non-contact mode* atp.

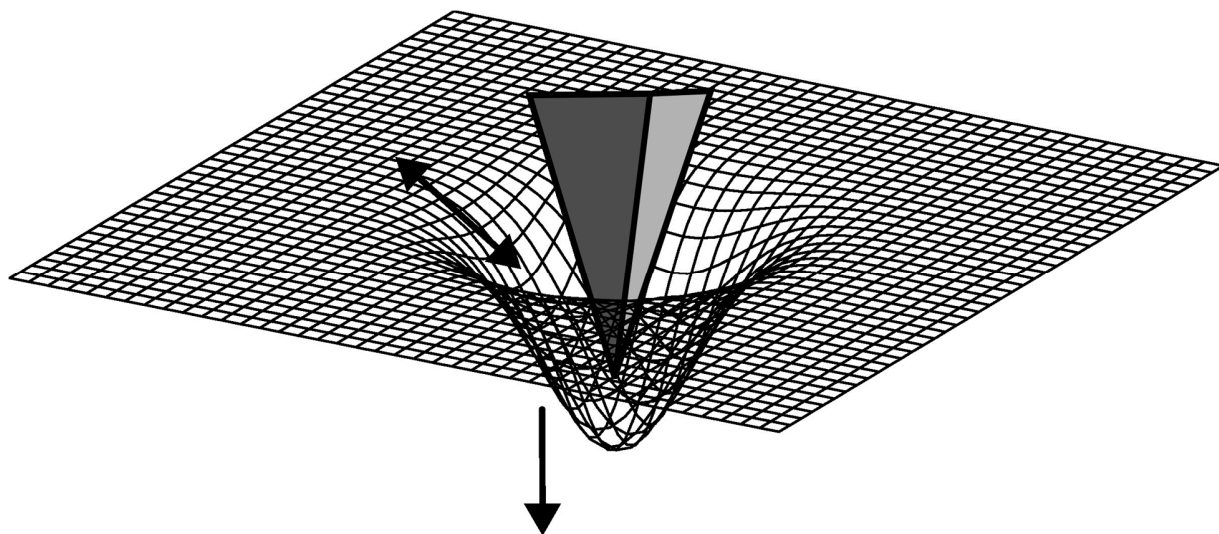
AFM silová spektroskopie

Princip AFM umožňuje zjišťování celé řady dalších modalit. Např. je možné využít hrot který je citlivý na magnetické pole s studovat magnetické vlastnosti povrchu (různě orientované domény atp.) Také je možné na hrot deponovat ligand (nějakou biologickou molekule) a studovat její afinitu k různým místům na buňce (silnější v místě receptorů pro ligand). Lze ho využívat i k mechanické stimulaci buněk.

Využitím, kterému se budeme věnovat více, je tzv. silová spektroskopie (*force spectroscopy*). Při té se provádíme analýzu průběhu síly v závislosti na vzdálenosti od vzorku (jako na obrázku 1). Na základě tvaru této křivky jsme schopni usuzovat o mechanických vlastnostech vzorku.

Při měření v módů silové spektroskopie přístroj nejprve přibližuje bázi kantilevru k povrchu vzorku a poté ji zase oddaluje a zaznamenává změnu signál na diodách (úměrnou síle). Je třeba zdůraznit, že při tomto pohybu dochází jak k deformaci povrchu vzorku tak k deformaci kantilevru. Pokud je hrot tlačěn proti velmi tvrdému materiálu (např. sklu), dochází především k deformaci kantilevru. Toho lze využít při kalibraci přístroje – tlačení hrotu do tvrdého povrchu získáváme závislost změny signálu diod na posunu kantilevru. Tato závislost je obecně ovlivněna i uložením kantilevru do přístroje a proto je kalibraci potřeba pokaždé opakovat. Při znalosti této závislosti je možné pomocí pružinové konstanty získat vztah mezi změnou signálu na diodě a silou mezi hrotem a povrchem (změna signálu diod je úměrná ohybu kantilevru a ten přes pružinovou konstantu posunu kantilevru). Získání pružinové konstanty je obecně složitý problém, ale v našem případě budeme využívat metody využívající měření rezonančních vlastností kantilevru, kterou systém našeho mikroskopu umožňuje.

Na deformaci vzorku lze pohlížet jako na deformaci v axiální ose (dochází k stlačování materiálu ve směru pohybu) a deformaci ve směru kolmém na osu (dochází k natahování materiálu, jak hrot protlačuje povrch dovnitř). Znázornění těchto deformací je na obrázku 4. U ideálně pružného izotropního materiálu je možné tyto mechanické vlastnosti úplně popsat pomocí dvou skalárních parametrů. Většinou se k tomuto účelu volí Youngův modul pružnosti a Poissonova konstanta. K určení těchto parametrů se využívají modely interakce hrotu a materiálu. V praxi se využívají hlavně dva modely. V Hertzově modelu je hrot uvažován jako sférický a ve Sneddonově jako kónický.



Obrázek 4: Znázornění axiální a kolmé deformace vzorku.

V obou modelech je pro biologické vzorky Poissonova konstanta uvažována fixně jako $\nu = 0,5$. Tyto modely poskytují teoretickou závislost mezi, ze které je možné fitem závislosti deformace na síle určit Youngův modul pružnosti E .

Sneddonův model pro kónický hrot:

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \delta^2,$$

kde δ je deformace, F je síla a α je polovina úhlu vrcholu jehlanu.

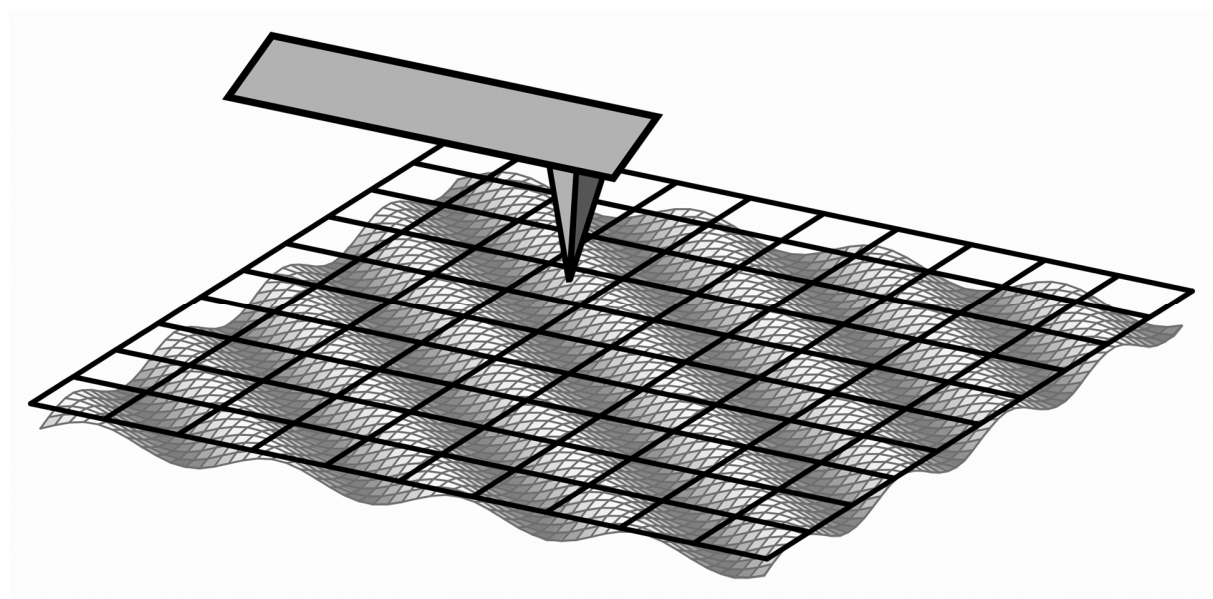
FBMI ČVUT

Hertzův model pro sférický hrot je pak:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^{\frac{3}{2}},$$

kde R je poloměr hrotu.

Speciálním modem provádějícím silovou spektroskopií je tzv. *force mapping*. Přístroj při něm provádí měření v pravidelné matici a vytváří tak mapu mechanických vlastností vzorku. Na rozdíl od módů pro výškové mapování povrchu není pro každý bod zaměřována jen jedna hodnota výšky (a dalších několika parametrů měření) ale celá silová křivka. Znamená to samozřejmě větší získanou informaci o vzorku, ale také delší dobu měření. Stejně tak zpracování a vizualizace dat se stávají komplexnější.



Obrázek 5: Force mapping mode. Přístroj postupně provádí indentaci v jednotlivých bodech v určené oblasti (jednotlivé čtverce) a pro každý bod zaznamená křivku síla–vzdálenost.

Instrumentace

Pro AFM je specifické, že dochází k silovému kontaktu mezi detektorem a vzorkem. Tento kontakt je zprostředkovávám pomocí kantilevru a hrotu. Hrot musí být velmi ostrý, aby byl schopný zobrazit nejjemnější strukturu povrchu vzorku. Z podstaty věci má tak tato součáska umezenou životnost a je velmi náchylný na poškození. K poškození může dojít při nevhodné manipulaci, ale dochází k němu i při samotném používání. Hrot je jednak mechanicky opotřebováván, jednak při měření biologických vzorků, se některé biomolekuly mohou na hrotu zachytávat a tím měnit jeho vlastnosti.

Hroty se liší velikostí a tvary. Velikost hrotu ovlivňuje výsledný obrázek. Jednoduše se dá říct, že hrot nezobrazí dobře menší struktury než je on sám. Odborněji lze říct, že získaný snímek lze chápat jako konvoluc tvaru hrotu s tvarem povrchu. Typicky se používají jehlanové hroty různých tvarů pro zoprazování povrchů. Pro silové mapování měkkých vzorků se hodí spíše kónické nebo sférické hroty. Existují speciální hroty pro měření magnetických, elektrických a dalších vlastností. Na hroty je také možné deponovat různé molekuly a sledovat jak ovlivňují interakci se vzorkem.

Kantilevr je pak důležitý pro své mechanické vlastnosti – měkkí nosníky (a tedy slabší síly) se hodí pro kontaktní mód, tužší pak pro oscilační. Tvrdost nosníku se charakterizuje silovou konstantou k . Jako měkkí se většinou označují nosníky s $k < 1$ N/m, tuhé pak $k > 10$ N/m. Tuhost zároveň ovlivňuje vhodných

FBMI ČVUT

rozsah frekvencí pro oscilační mód. Pro měření ve vzduchu se hodí tužší hroty s vyšší frekvencí (cca and 200kHz), pro měření v roztocích s nižší (cca pod 40 kHz).

Určitou roli také hraje podkladový materiál. Pokud by velikost měřeného vzorku byla menší než velikost nerovností na povrchu vzorku, měření by bylo obtížné. Pro měření buněk (cca desítky 10 μm) je dostačující obyčejné podložní sklíčko s nerovnostmi v řádu desítek nanometrů. Pro menší vzorky (proteiny) se využívá například slída, na které lze dosáhnout téměř atomárně rovných vrstev.

Zdroje

Eaton, P., & West, P. (2010). *Atomic Force Microscopy*. Oxford: Oxford University Press