

УДК 53.084.2

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПАРАМЕТРОВ ЗОНДОВ СКАНИРУЮЩЕГО ЗОНДОВОГО МИКРОСКОПА НА ВИЗУАЛИЗАЦИЮ РЕЛЬЕФА ПОВЕРХНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

А.В. Стовпяга, И.Н. Лобова

Проведен качественный анализ изображений рельефа поверхности биологических объектов (эритроцитов), получаемых с помощью сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) при использовании зондов различного типа с различными геометрическими параметрами. Прослежено влияние геометрических параметров зондов на СЗМ-изображения образцов и определен ориентировочный критерий отбора зондов для исследования эритроцитов.

**Ключевые слова:** сканирующая зондовая микроскопия, растровая электронная микроскопия, нанопипетка, нанозонды, анализ изображений.

### Введение

Одним из основных инструментов нанотехнологий является сканирующая зондовая микроскопия [1, 2], объединяющая широкий спектр современных средств исследования и модификации поверхностей различных материалов, в том числе и биологического происхождения, например, эритроцитов. В последнем случае существует потребность применения универсальных зондов, в частности, нанопипеток [3], дающих возможность одновременно исследовать рельеф поверхности биообъектов, картировать их жесткость и мембранную проводимость в режиме ионных токов. В данной работе производился сравнительный анализ СЗМ-изображений, полученных при использовании нанопипетки, а также вольфрамового и кремниевого зондов.

### Объект, оборудование и методика исследования

Объектом исследования являлись эритроциты, нанесенные на стеклянную подложку. В качестве эталона для калибровки СЗМ и оценки соответствия полученных изображений поверхности реального объекта применялась калибровочная мера в виде периодической двумерной решетки (TGT-решетка фирмы NT-MDT) (рис. 1). Размер решетки – 5×5 мм, наибольшее расстояние между двумя соседними конусными пиками  $3 \pm 0,05$  мкм, высота пика 0,3–0,5 мкм, радиус закругления острия пика около 10 нм.

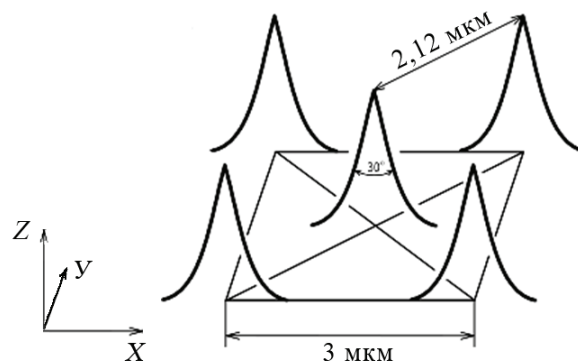


Рис. 1. Схема TGT-решетки

В процессе исследований использовались растровый электронный микроскоп (РЭМ) «Inspect», СЗМ «NTEGRA Aura» и СЗМ «NANOEDUCATOR».

В случае СЗМ, как известно, сканирование осуществляется острым твердотельным зондом (радиус закругления зонда 10–100 нм), а РЭМ позволяет визуализировать поверхность образца за счет ее сканирования электронным зондом диаметром 5–10 нм.

Методика проведения исследования включала следующие этапы:

- калибровка РЭМ с помощью калибровочной меры (TGT-решетки);
- определение геометрических параметров зондов для СЗМ с помощью РЭМ;
- калибровка СЗМ с помощью TGT-решетки с использованием зонда в виде кремниевого кантилевера на СЗМ «NTEGRA Aura» и зондов в виде вольфрамового острия и стеклянной нанопипетки, закрепленных на пьезорезонансном датчике СЗМ «NANOEDUCATOR» [4, 5];
- получение и анализ изображений поверхности эритроцитов с использованием кремниевого зонда СЗМ «NTEGRA Aura», вольфрамового зонда и нанопипетки на СЗМ «NANOEDUCATOR».

### Калибровка РЭМ

На рис. 2 представлено изображение пиков TGT-решетки, полученное с помощью РЭМ «Inspect». Расстояния между соседними пиками составляет 3 мкм, что соответствует паспортным данным.

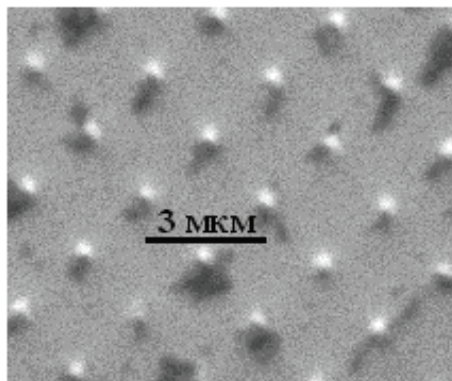


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение TGT-решетки (РЭМ «Inspect»)

### Определение геометрических параметров зондов

- С помощью РЭМ определены геометрические параметры нанопипетки и вольфрамового острия:
- радиус острия нанопипетки около 286 нм с углом при вершине около  $12^\circ$  (рис. 3);
  - радиус острия вольфрамового зонда около 57 нм с углом при вершине около  $11^\circ$  (рис. 4).

Параметры кремниевого зонда взяты из паспортных данных: радиус острия – 10 нм, угол при вершине – не более  $10^\circ$ .

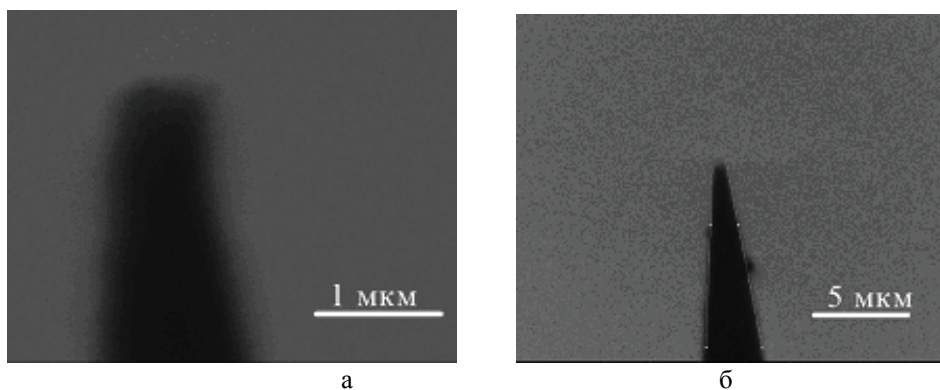


Рис. 3. Электронные микрофотографии нанопипетки (РЭМ «Inspect»): а) радиус вершины около 286 нм; б) угол при вершине около  $12^\circ$

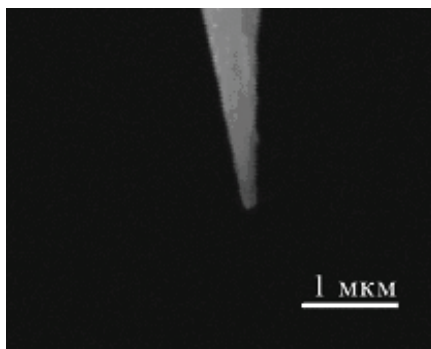


Рис. 4. Электронные микрофотографии вольфрамового зонда (РЭМ «Inspect»). Радиус закругления при вершине около 57 нм, угол при вершине около  $11^\circ$

Чем меньше радиус и угол при вершине острия, тем, как известно, лучше пространственное разрешение СЗМ и тем больше соответствие получаемых СЗМ-изображений реальному рельефу поверхности сканируемых объектов. Как следует из приведенных данных, наилучшим разрешением обладает кремниевый зонд. Ниже будет проведено сравнение результатов исследования поверхности эритроцитов, полученных с использованием различных зондов.

### Калибровка СЗМ

На рис. 5 представлены результаты калибровочного сканирования остроконечных пиков TGT-решетки с помощью кремниевого зонда. Расстояния между соседними пиками после проведения калибровки стали близки к паспортным данным TGT-решетки. В процессе процедуры калибровки определялась чувствительность микросканера СЗМ. Адекватность процесса калибровки подтверждается соответствием периода на СЗМ-изображении и паспортными данными для периода TGT-решетки.

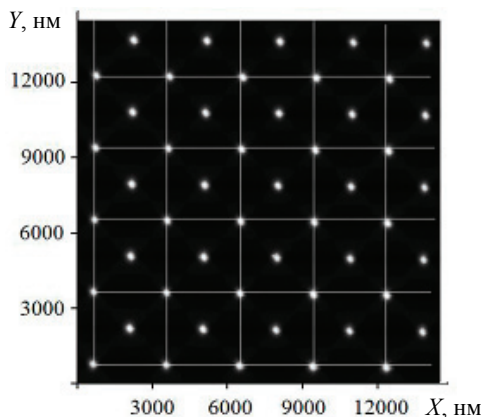


Рис. 5. СЗМ-изображения TGT-решетки, полученные кремниевым зондом

На рис. 6 представлены 3D-изображения остроконечных пиков TGT-решетки, полученные с помощью кремниевого зонда (СЗМ «NTEGRA Aura»), вольфрамового зонда и зонда в виде нанопипетки (СЗМ «NANOEDUCATOR»). Поскольку радиус закругления вершин остроконечных пиков TGT-решетки меньше, чем характерный размер вершин вольфрамового острого и нанопипетки, то на СЗМ-изображениях, представленных на рис. 6, а, б, в, фактически наблюдается периодически повторяющийся рельеф вершин используемых зондов. Из рис. 6, а, б, в, видно, что наименьший радиус, как и ожидалось, имеет кремниевый зонд, а наибольший характерный размер при вершине имеет стеклянная нанопипетка. Кроме того, следует отметить, что в случае со стеклянной нанопипеткой на СЗМ-изображении (рис. 6, в) можно обнаружить раздвоение пиков, связанное с наличием внутреннего отверстия в нанопипетке. В этом случае нанопипетка в процессе сканирования взаимодействует с вершиной пика TGT-решетки одним краем отверстия, затем проваливается в отверстие и после этого взаимодействует с вершиной пика другим краем.

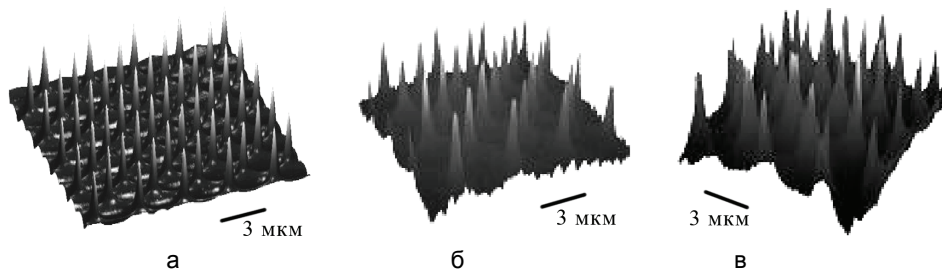


Рис. 6. 3D-изображения TGT-решетки: а) кремниевый зонд (СЗМ «NTEGRA Aura»); б) вольфрамовый зонд; в) нанопипетка (СЗМ «NANOEDUCATOR»)

Полученные 3D-изображения вершин нанозондов подчеркивают решающее влияние геометрических параметров зондов на качество СЗМ-изображений. В случае использования кремниевого зонда все пики имеют остроконечные вершины. Сканирование вольфрамовым зондом (менее острым, чем кремниевый) сглаживает изображение пиков TGT-решетки, так как радиус вольфрамового зонда больше, чем радиус пиков решетки, а использование нанопипетки приводит к раздвоению острых пиков на СЗМ-изображении.

### Получение и анализ изображений поверхности эритроцитов

Как и ожидалось, лучшие изображения поверхности эритроцитов получены на СЗМ «NTEGRA Aura» с помощью кремниевого зонда с оптической схемой регистрации отклонения кантилевера (рис. 7, а). В случае вольфрамового зонда с пьезорезонансным датчиком силового взаимодействия (СЗМ «NANOEDUCATOR») наблюдается менее точная визуализация рельефа (рис. 7, б), которая, однако, позволяет производить картирование локальной жесткости поверхности эритроцита. При использовании этого же пьезорезонансного датчика с зондом в виде стеклянной нанопипетки (рис. 7, в) наблюда-

лись наибольшие искажения при визуализации поверхности эритроцитов, что вызвано как большим радиусом острия нанопипетки, так и наличием в ней отверстия. Вместе с тем зонд-нанопипетка дает правильную информацию о размерах и средней топографии клетки.

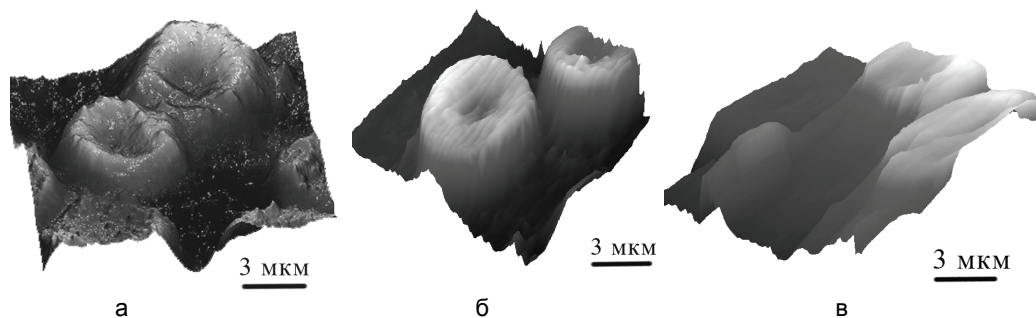


Рис. 7. СЗМ-изображения эритроцитов: а) кремниевый зонд (СЗМ «NTEGRA Aura»); б) вольфрамовый зонд, в) нанопипетка (СЗМ «NANOEDUCATOR»)

### Заключение

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- наиболее подробные и точные сведения о размерах, форме и рельефе поверхности эритроцитов получаются при использовании кремниевых зондов с оптической схемой регистрации отклонения кантилевера;
- вольфрамовый зонд с пьезорезонансным датчиком и большим радиусом вершины, чем у кремниевого, позволяет очертить внешние границы и рельеф эритроцитов менее точно и с меньшим количеством разрешаемых деталей рельефа;
- зонд с пьезорезонансным датчиком силового взаимодействия, несмотря на сложную форму в виде цилиндра с внутренним отверстием, позволяет получить информацию о размерах и усредненной топографии поверхности эритроцитов.
- зонд в виде стеклянной нанопипетки представляет особый интерес в связи с возможностью проведения СЗМ-исследований в жидкости с одновременным измерением как топографии поверхности, так и карты распределения ионных токов.

Качественный анализ полученных в данной работе результатов позволяет сделать вывод о том, что для визуализации рельефа эритроцитов с помощью СЗМ с зондом в виде нанопипетки целесообразно применять нанопипетки с параметрами не хуже, чем у использованного в работе вольфрамового зонда. Исследования эритроцитов с применением в СЗМ универсального зонда-нанопипетки с достаточным пространственным разрешением возможны при радиусе вершины зонда не более 60 нм. Данную величину можно рассматривать как ориентировочный критерий отбора нанопипеток по геометрическим параметрам.

Работа выполнена в рамках реализации и при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (НК-556П/89, ГК П557).

### Литература

1. Binning G., Quate C.F. Atomic Force Microscope // *Physical Review Letters*. – 1986. – V. 56. – № 9. – P. 930–933.
2. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. – М.: Техносфера, 2005. – 144 с.
3. Shevchuk A., Frolenkov G., Sanchez D., James P.S. Imaging Protein in Membranes of Living Cells by High-Resolution Scanning Ion Conductance Microscopy // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2006. – V. 45(14). – P. 2212–2216.
4. Быков В.А., Васильев В.Н., Голубок А.О. Учебно-исследовательская мини-лаборатория по нанотехнологии на базе сканирующего зондового микроскопа «НАНОЭДЬЮКАТОР» // *Российские нанотехнологии*. – 2009. – Т. 4. – № 5–6. – С. 45–47.
5. Голубок А.О., Васильев А.А., Кerpелева С.Ю., Котов В.В., Сапожников И.Д. Датчик локального силового и туннельного взаимодействия в сканирующем зондовом микроскопе // *Научное приборостроение*. – 2005. – Т. 15. – № 1. – С. 62–69.

**Лобова Инна Николаевна**

– Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики, студентка, inna\_kurchatov@mail.ru

**Стовпяга Александр Владимирович**

– Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики, аспирант, sanja100v@mail.ru