

УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПО ХИМИИ И ФИЗИКЕ ПОЛИМЕРОВ
Физический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
Центр перспективных технологий

*Сканирующая зондовая микроскопия
нуклеиновых кислот*

М.О. Галлямов, И.В. Яминский

Москва 1998

Введение

Сканирующая зондовая микроскопия, возникшая с момента создания Биннигом и Рорером в 1981 г. сканирующего туннельного микроскопа (СТМ), объединяет разнообразие современных методов исследования *поверхности* с нанометровым и субнанометровым пространственным разрешением. Общей чертой всех сканирующих зондовых микроскопов является способ получения информации о свойствах исследуемой поверхности: микроскопический *зонд* сближается с поверхностью до установления между зондом и образцом баланса взаимодействий определенной природы¹, после чего осуществляется *сканирование*.

В процессе *сканирования* зонд движется, строка за строкой, над определенным участком поверхности заданной площади (которая определяется числом прописываемых строк — *сканов*, их длиной и расстоянием между ними). Это движение осуществляется при помощи *пьезоманипулятора*, изменение размеров которого (под действием разности потенциалов, приложенной к управляющим электродам на его поверхности) приводит к относительному перемещению образца и зонда в трех направлениях. При движении зонда по скану система *обратной связи* поддерживает величину какого-либо выбранного типа взаимодействия (интенсивность которого зависит от относительного расстояния зонд-образец — d) на заданном уровне (что фиксирует расстояние d), при этом может осуществляться регистрация в реальном масштабе времени как сигнала обратной связи, так и величины ряда дополнительных параметров (например, интенсивности дополнительных взаимодействий).

1. Основные принципы сканирующей зондовой микроскопии

Характером того типа взаимодействия, которое выбирается для фиксации или измерения при сканировании, и определяется принадлежность конкретного прибора к тому или иному виду в рамках общего семейства зондовых микроскопов². Рассмотрим общие принципы работы зондового микроскопа.

¹ в этот баланс могут включаться силы притяжения или отталкивания (электростатические, магнитные, Ван-дер-Ваальсовы и пр.), процессы обмена туннелирующими электронами, фотонами и т.д.

² это деление в значительной степени условно: достаточно универсальный прибор позволяет проводить анализ различных типов взаимодействий посредством лишь выбора адекватного режима работы

1.1 Обобщенная модель сканирующего зондового микроскопа

Итак, все сканирующие зондовые микроскопы характеризуются наличием некоторого выбранного взаимодействия между зондом и образцом, которое используется системой обратной связи для фиксации расстояния зонд-образец (d) при сканировании. Для обеспечения высокой разрешающей способности прибора интенсивность данного взаимодействия должна достаточно резко зависеть от расстояния d . Для атомно-силового микроскопа этому условию удовлетворяют силы отталкивания крайних атомов зонда и образца, а для туннельного микроскопа — экспоненциальный рост величины туннельного тока с уменьшением туннельного зазора.

Общая модель работы сканирующего зондового микроскопа такова. При сканировании (движении зонда в плоскости XY по *скану*) система обратной связи варьирует Z -координату зонда, поддерживая на заданном уровне сигнал, соответствующий амплитуде рабочего типа взаимодействия (обозначим это взаимодействие $A(X, Y, Z)$). Отработка в процессе сканирования зависимости $A(X, Y, Z) = \text{const}$ вариацией Z эквивалентна детектированию зависимости $Z|_{A=\text{const}}(X, Y)$, которая определенным образом коррелирует с локальными свойствами исследуемой поверхности. Этот режим измерения соответствует постоянству значения A и называется, в зависимости от типа микроскопа, либо режимом постоянного туннельного тока (в случае СТМ), либо режимом постоянной силы (в контактном АСМ), либо режимом постоянной амплитуды колебаний (в АСМ прерывистого контакта). Если интенсивность взаимодействия $A(X, Y, Z)$ одинакова в разных точках исследуемой поверхности, то получаемая двумерная функция $Z|_{A=\text{const}}(X, Y)$ будет соответствовать профилю поверхности или *топографии*. В противном случае она будет носить более сложный характер и являться суперпозицией³ карт поверхностной топографии и поверхностного распределения интенсивности A .

Наряду с топографией в режиме постоянного взаимодействия сканирующая зондовая микроскопия позволяет получать широкий спектр других зависимостей $\Phi|_{A=\text{const}}(X, Y)$, несущих полезную информацию о различных свойствах поверхности. Здесь функция $\Phi(X, Y)$ измеряется при осуществлении режима постоянного взаимодействия A (и, следовательно, во многих случаях и постоянного расстояния зонд-образец) и может отображать величину какого-либо взаимодействия, отличного от A , на топографической поверхности $Z|_{A=\text{const}}(X, Y)$.

На принципе измерения функции $\Phi(X, Y)$ при осуществлении режима $A = \text{const}$ основан целый ряд зондовых микроскопов. Можно упомянуть о таких модификациях, как магнитно-силовой микроскоп (измерение сил между намагниченным зондом и поверхностью, обладающей магнитными свойствами), микроскоп ближнего поля (детектирование электромагнитного поля, проходящего через миниатюрную диафрагму, расположенную в ближней зоне источника), электростатический силовой микроскоп (с образцом взаимодействует проводящий заряженный зонд) и т.д. [1]. Во всех этих микроскопах анализ соответствующего взаимодействия осуществляется при поддержании

³на самом деле, поскольку A характеризуется некоторой конечной областью взаимодействия, то речь должна идти не о *суперпозиции*, а о *свертке*; однако мы не будем заострять на этом внимание

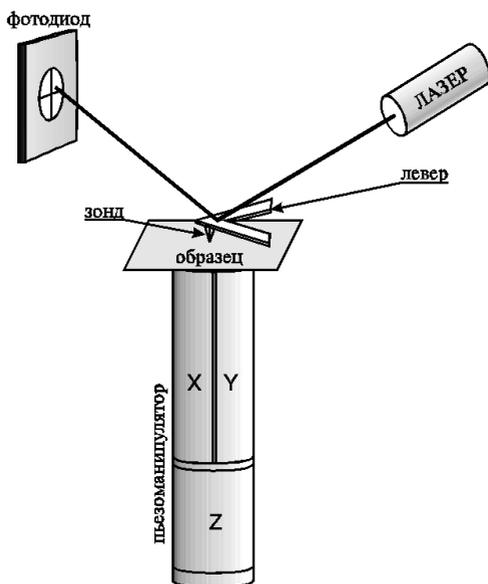


Рис. 1. Основные узлы механической части атомно-силового микроскопа

постоянным зазора между зондом и образцом, что осуществляется по рассмотренным ниже схемам режима контакта или прерывистого контакта⁴ атомно-силового микроскопа.

1.2 Контактная атомно-силовая микроскопия

Для атомно-силовой микроскопии контакта тем типом взаимодействия, фиксация которого осуществляется при сканировании, является сила взаимодействия между контактирующими зондом и образцом. Для фиксации и поддержания на заданном уровне величины силового взаимодействия в режиме контакта используется следующая схема (см. рис. 1). Зонд (микроострие) расположен на свободном конце миниатюрной гибкой консоли — *левера* или *кантилевера* (другой конец консоли зафиксирован в держателе). Механическая система (на рис. не показана) сближает зонд и образец до контакта; в контакте происходит изгиб кантилевера, величина которого фиксируется прецизионным датчиком по смещению луча на 4-х секционном фотодиоде. Величина изгиба будет однозначно определять контактную силу, а поддержание величины изгиба обратной связью на заданном уровне в процессе сканирования позволит “прописать” зондом профиль поверхности. Сигнал обратной связи, поддерживающей постоянный изгиб левера

⁴или близких к ним

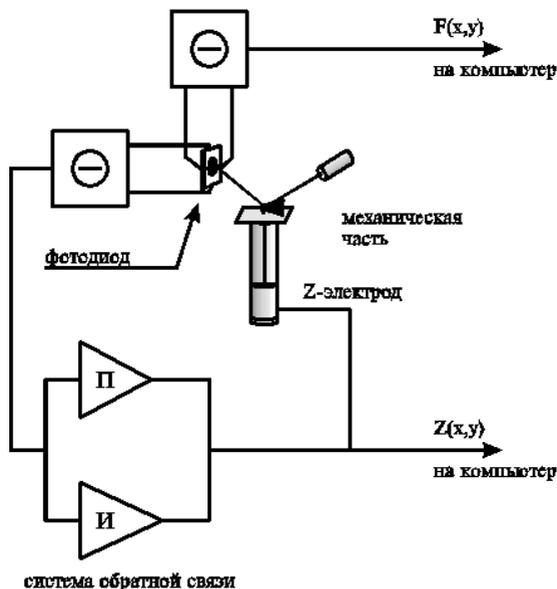


Рис. 2. Схема атомно-силового микроскопа. В схеме указаны: механическая часть микроскопа и система обратной связи, включающая пропорциональное и интегральное звенья. Три сигнала — $F_{mp}(x, y)$, отображающий величину тангенциальных сил (сил трения), $\Phi|_{defl}(x, y)$, сигнал отклонений (сигнал ошибки обратной связи), и $Z(x, y)$ — сигнал обратной связи — подаются в компьютер и выводятся на экран монитора.

(постоянную силу), и будет нести информацию о топографии поверхности.

В большинстве типов атомно-силовых микроскопов для фиксации силы, как правило, используют оптические датчики изгиба кантилевера, реализованные по следующей схеме: луч лазерного диода падает под углом на поверхность лезера и отражается в центр четырехсекционного фотодиода, при изгибе лезера в нормальном или торсионном направлении возникает разница между сигналами соответствующих участков фотодиода: верхний/нижний сегменты или правый/левый сегменты соответственно, см. рис. 1.

Разностный сигнал правых и левых сегментов фотодиода, отображающий величину тангенциальных сил (сил трения), действующих на зонд при сканировании, выводится в компьютер и отображается на экране монитора. Разностный сигнал верхних и нижних сегментов фотодиода⁵ проходит через пропорциональное и интегральное звенья обратной связи, сравнивается с опорным, их разность усиливается и подается на Z электрод пьезоманипулятора, приводя к смещению образца в вертикальном направлении, см. рис. 2. Одновременно сигнал обратной связи также поступает в компьютер и отобра-

⁵ $\Phi_{defl}(x, y)$ который также выводится на компьютер

жается на экране монитора, неся информацию о топографии поверхности.

Результатом АСМ-исследования поверхности в режиме контакта могут служить зависимости:

1. $Z(X, Y)$ — сигнал обратной связи (напряжение на Z электроде и, соответственно, пропорциональное ему перемещение образца в Z направлении, в зависимости от координат X и Y). Эта зависимость детектируется при условии поддержания на заданном уровне величины силового взаимодействия A обратной связью. Зависимость $Z(X, Y)$ в наибольшей степени коррелирует с *топографией* поверхности.
2. $F_{mp}(X, Y)$ измеряемая по разности сигналов правых и левых сегментов фотодиода. Эта зависимость отражает интенсивность тангенциальных сил, действующих на зонд при сканировании, и коррелирует с картой поверхностного распределения локального коэффициента *трения*⁶.
3. $\Phi_{defl}(X, Y)$ — сигнал, пропорциональный отклонению кантилевера в направлении нормали (разностный сигнал верхних и нижних сегментов детектирующего фотодиода). Если бы обратная связь работала идеально, мгновенно отслеживая при сканировании любые топографические изменения, то изгиб кантилевера оставался всегда постоянным и данный разностный сигнал отсутствовал. На самом же деле обратная связь может отследить сигнал, частота которого меньше некоторой верхней граничной частоты f_{cp} . Из-за этого при сканировании обратная связь не успевает среагировать на *быстрые* изменения поверхностной топографии, что приводит к возникновению сигнала $\Phi_{defl}(X, Y)$. Его величина отображает значение *градиента* к поверхности — сигнал Φ_{defl} будет тем больше, чем выше значение $\partial Z/\partial X$ ⁷. Режим измерения зависимости Φ_{defl} называется режимом отклонений (отсюда английский термин deflection), подразумевается, что в этом режиме измеряется изменение отклонения иглы при сканировании.

1.3 Атомно-силовая микроскопия прерывистого контакта

В АСМ прерывистого контакта зонд совершает колебательные движения в направлении Z , лишь в нижней точке своей траектории находясь в контакте с образцом. В рассматриваемом режиме работы АСМ дополнительный пьезоманипулятор возбуждает вынужденные колебания левера на его резонансной частоте в направлении оси Z . При сближении зонда и образца амплитуда колебаний будет уменьшаться — размах колебаний будет ограничиваться соударениями с образцом. Т.о., поскольку, амплитуда колебаний будет зависеть от среднего⁸ значения расстояния зонд-образец, то фиксация

⁶на самом деле на эту карту накладывается карта величины градиента к поверхности: при движении зонда “в горку” латеральный изгиб кантилевера больше, чем при движении “с горки” (при равных коэффициентах трения)

⁷если X — направление строки сканирования (скана)

⁸по периоду колебаний

ее на заданном уровне в процессе сканирования позволит прописать профиль поверхности. Сигнал обратной связи, осуществляющий фиксацию амплитуды колебаний, и в этом случае будет нести информацию о профиле поверхности.

Результатом АСМ-исследования поверхности в режиме прерывистого контакта могут являться зависимости:

1. $Z(X, Y)$ полученная при условии поддержания обратной связью амплитуды колебаний A на заданном уровне. Зависимость $Z(X, Y)$ в наибольшей степени отображает *топографию* поверхности.
2. $\Phi_{\Delta\varphi}(X, Y)$ отображающая сдвиг фаз между вынужденными колебаниями левера и вынуждающей силой. Сдвиг фаз в резонансе составляет величину $\pi/2$, это значение соответствует случаю отсутствия контакта зонда с образцом при колебаниях. При сближении зонда и образца система частично выходит из резонанса, поскольку включается дополнительная упругая сила (отталкивания зонда и образца при контакте), наличие градиента которой сдвигает резонансную частоту. Это сказывается на уменьшении амплитуды колебаний и дает вклад в сдвиг фаз $\Phi_{\Delta\varphi}$. С другой стороны, наряду с упругими (недиссипативными) процессами, контактное взаимодействие зонда и образца характеризуется и неупругими, приводящими к диссипации энергии колебаний левера. Неупругие процессы также уменьшают амплитуду колебаний, но, в этом случае, без вклада в сдвиг фаз $\Phi_{\Delta\varphi}$. Т.о. сигнал $\Phi_{\Delta\varphi}(X, Y)$ отображает баланс *вязко-упругих* свойств исследуемой поверхности.

1.4 Силы взаимодействия зонда и образца

Существенным вопросом атомно-силовой микроскопии является анализ баланса сил взаимодействия зонд-образец. Физическая природа и характер данных сил в общем случае достаточно сложны, поскольку они определяются поверхностными и геометрическими свойствами материалов зонда и образца, свойствами среды, в которой проводится исследование и т.д. Поэтому привлечем некоторые простые модельные представления, позволяющие раскрыть основные особенности взаимодействия зонда и образца.

Так, в случае проведения АСМ-исследований *незаряженных* поверхностей в естественной атмосфере основной вклад в силовое взаимодействие зонд-образец дают: силы отталкивания, вызванные механическим контактом крайних атомов зонда и образца, силы Ван-дер-Ваальса, а также капиллярные силы, связанные с наличием пленки адсорбата между контактирующими поверхностями.

Для модели зонда, кончик которого характеризуется некоторым радиусом кривизны R , и бесконечного плоского образца Ван-дер-Ваальсово взаимодействие зонд-образец описывается формулой Гамакера, полученной в приближении аддитивности дисперсионного взаимодействия [2]:

$$F = \frac{AR}{12d^2}, \quad (1)$$

где d — величина зазора между зондом и образцом, R — радиус кривизны зонда, A — константа Гамакера⁹:

$$A = \pi \rho_1 \rho_2 \beta.$$

Здесь ρ_1 и ρ_2 — плотности материалов зонда и образца, β — константа в законе Лондона для энергии дисперсионного взаимодействия двух нейтральных атомов в вакууме:

$$U = -\frac{\beta}{r^6}.$$

Поскольку $\beta \sim E_{am} r_{am}^6$, $\rho \sim 1/r_{am}$, здесь r_{am} — атомный радиус, E_{am} — атомная энергия:

$$E_{am} = \frac{m e^4}{\hbar^2},$$

где m и e — масса и заряд электрона, то для константы Гамакера справедлива оценка: $A \sim E_{am}$. Действительно, экспериментальные значения дают $A \sim (0,4-4) \times 10^{-19}$ Дж.

Вклад капиллярных сил во взаимодействие можно оценить по формуле:

$$F = \frac{4\pi R \gamma \cos \theta}{1 + D/d}, \quad (2)$$

где R — радиус кривизны зонда, γ — поверхностное натяжение пленки адсорбата (для воды $\gamma \sim 0,073$ Дж/м), θ — контактный угол для материала зонда (образца) и пленки, D — расстояние зонд-образец, d — глубина погружения зонда в пленку.

При работе атомно-силового микроскопа в контактном режиме зонд и образец приводятся в состояние механического контакта, и изгиб кантилевера отражает баланс взаимодействий: Ван-дер-Ваальсового, капиллярного и сил отталкивания крайних атомов зонда и образца. При этом силы притяжения (особенно капиллярные — при исследованиях в естественной атмосфере) играют негативную роль, увеличивая давление на образец.

Приведем некоторые оценки. Радиус кривизны кончика зонда кантилеверов обычно составляет величину 10 нм. Тогда, согласно формуле (1), силы Ван-дер-Ваальсового притяжения (в контакте $d \sim 0,2$ нм) составят величину $F_{ВдВ} \sim 10^{-9} \div 10^{-8}$ Н, а капиллярные силы, согласно формуле (2), $F_{кан} \leq 10^{-8}$ Н (это максимальное значение: $\cos \theta \sim 1$, $D/d \ll 1$).

1.5 Контакт зонда и образца

Для оценки давления на образец необходимо знать площадь контакта (очевидно, что это величина конечная: если площадь контакта $S_{конт} \rightarrow 0$, то давление на образец $P_{обр} \rightarrow \infty$). Рассмотрим область контакта: пусть игла действует на образец с силой F , тогда образец будет деформироваться в направлении приложенной силы (при этом

⁹ модели, учитывающие неаддитивность дисперсионного взаимодействия, дают другие выражения, позволяющие, в частности, получать отрицательные значения для константы Гамакера, что описывает случай возникновения дисперсионных сил отталкивания

областью контакта, в общем случае, будет эллипс с полуосями a и b) и зонд приблизится с образцом на некоторое расстояние h . Величина деформации может быть определена на основании контактной теории Герца, исходя из следующих формул [3]:

$$\begin{aligned} h &= \frac{FD}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{d\xi}{\sqrt{(a^2 + \xi)(b^2 + \xi)\xi}}, \\ A &= \frac{FD}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{d\xi}{(a^2 + \xi)\sqrt{(a^2 + \xi)(b^2 + \xi)\xi}}, \\ B &= \frac{FD}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{d\xi}{(b^2 + \xi)\sqrt{(a^2 + \xi)(b^2 + \xi)\xi}}, \end{aligned} \quad (3)$$

где A и B — главные значения тензора $\chi_{\alpha\beta} + \chi'_{\alpha\beta}$, образованного тензорами, характеризующими кривизну поверхностей зонда и образца в точке контакта. Здесь

$$D = \frac{3}{4} \left(\frac{1 - \sigma^2}{E} + \frac{1 - \sigma'^2}{E'} \right), \quad (4)$$

где E , E' , σ и σ' модули Юнга и Пуассона материалов зонда и образца.

Выписанные зависимости являются системой нелинейных уравнений с неявной зависимостью от искоемых параметров, поэтому для успешного применения контактной теории деформаций необходимо рассмотреть основные частные случаи, допускающие дополнительное упрощение выписанных соотношений. Рассмотрим два случая.

Контакт сферического зонда и сферического (или плоского) образца

Предположим, что зонд и образец вблизи точки контакта описываются сферическими поверхностями и характеризуются радиусами кривизны R и R' , тогда,

$$A = B = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)$$

и на основании (3) легко показать, что область контакта будет представлять собой окружность радиуса a :

$$a = (FD)^{1/3} \times \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)^{-1/3}, \quad (5)$$

причем для величины дополнительного сближения (за счет деформации) зонда и образца справедлива формула:

$$h = (FD)^{2/3} \times \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)^{1/3}. \quad (6)$$

В этих формулах F — сила, сдвливающая зонд и образец.

Воспользуемся формулой (5) для вычисления давления на образец:

$$P = \frac{F}{S} = \frac{1}{\pi} \times \left(\frac{F}{D^2} \right)^{1/3} \times \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)^{2/3} \quad (7)$$

Проведем оценку давления, которое зонд из нитрида кремния ($E = 10^{12}$ Па) с радиусом кривизны $R = 10$ нм, оказывает на гладкую поверхность подложки ($R' = \infty$, $E' = 10^{10}$ Па), если сила взаимодействия $F \sim 5 \times 10^{-9}$ Н. Подставляя значения в формулу (7) получаем оценку: $P \sim 10^9$ Па, что превышает предел прочности многих материалов, см. [4]¹⁰.

Возникает вопрос, почему же, в таком случае, АСМ позволяет проводить неразрушающие исследования широкого спектра материалов? Объяснение следующее:

1. Во-первых, значения пределов прочности (и других параметров, характеризующих разрушаемость материалов) определяются при приложении разрушающего давления к некоторой поверхности образца в заданном направлении. В нашем случае мы имеем дело с приложением к образцу локального давления, которое распределяется по трем направлениям.
2. Во-вторых, зонд оказывает воздействие на образец в течение достаточно малого промежутка времени $\tau \simeq a/V_{\text{скан}} = a/Lf$, где a — латеральный размер области контакта (5), L — длина скана (строки сканирования), f — частота строчной развертки. При типичных параметрах сканирования имеем оценку для времени взаимодействия зонда и образца при сканировании $\tau \sim 10^{-3} \div 10^{-5}$ сек, за это время необратимые процессы разрушения поверхности не успевают произойти.

Контакт сферического зонда и цилиндрического образца

Данная модель полезна при анализе деформации (при АСМ исследованиях) микро-частиц цилиндрической формы (вирусных частиц, линейных макромолекул и пр.). Из формул (3) следует:

$$h = \frac{2FD}{\pi b} K \left(\sqrt{1 - a^2/b^2} \right),$$

$$A = -\frac{1}{a} \frac{\partial h}{\partial a}, \quad (8)$$

$$B = -\frac{1}{b} \frac{\partial h}{\partial b},$$

где $K(k)$ — полный эллиптический интеграл.

¹⁰ например, пределы прочности (по сжатию) слюды: $\sigma_{в. сжс} = (0,4-0,5) \times 10^9$ Па, графита: $\sigma_{в. сжс} = (0,02-0,03) \times 10^9$ Па

Значения A и B для контакта сферы радиуса R и боковой поверхности цилиндра радиуса R' выражаются формулами:

$$A = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right), \quad (9)$$

$$B = \frac{1}{2R}.$$

Откуда следует, что при различных соотношениях радиусов образца и зонда параметр B может быть меньше или порядка параметра A .

Рассмотрим два случая:

Если $B < A$, то из соотношений (3) следует, что $a < b$. Если различие достаточно велико для выполнения условия $a^2 \ll b^2$, то можно воспользоваться асимптотикой полного эллиптического интеграла [5]:

$$K(k) = \ln \left(\frac{4}{k'} \right) + \dots, \quad (10)$$

где $k' = \sqrt{1 - k^2}$, из соотношений (8) получим:

$$h = \left(\frac{4}{\pi^2 C} \right)^{1/3} (C + 1) \times (FD)^{2/3} \times B^{1/3}, \quad (11)$$

где безразмерный параметр C зависит, вообще говоря, от отношения параметров эллипса a и b :

$$C = \ln \left(\frac{4b}{a} \right) - 1.$$

Воспользовавшись уравнениями (9, 10) можно показать, что имеет место соотношение:

$$C = \ln \left(\frac{4b}{a} \right) - 1 = \frac{Bb^2}{Aa^2}. \quad (12)$$

Из уравнения (12) при известном отношении B/A можно численно определить отношение b/a , и, соответственно, значение константы C . Численное решение показывает, что при анализе контакта сферического зонда и цилиндрического образца в большинстве случаев значение константы C лежит в интервале от 1 до 3. В частности, при анализе контакта зонда и молекулы нуклеиновой кислоты, с достаточной точностью можно воспользоваться соотношением $C \simeq 2$.

Запишем, также, выражение для давления на образец в рассматриваемом случае:

$$P = \frac{F}{\pi ab} = \left(\frac{1}{16\pi^2 C} \right)^{1/6} \times \left(\frac{F}{D^2} \right)^{1/3} \times (A^3 B)^{1/6} \quad (13)$$

Асимптотика (10) теряет применимость при выполнении условия $a \simeq b$, которое имеет место при $A \simeq B$.

В этом случае следует воспользоваться другой асимптотикой полного эллиптического интеграла:

$$K(k) = \frac{\pi}{2}(1+m)[1+\dots],$$

где $m = (1 - k')/(1 + k')$, а $k' = \sqrt{1 - k^2}$.

Тогда для величины сближения зонда и образца за счет деформации получим уравнение:

$$h = (FD)^{2/3} \times \left(\frac{1}{4A} + \frac{1}{4B} \right)^{-1/3}, \quad (14)$$

которое совпадает по своей структуре с уравнениями (6) и (11), а для величины давления на образец:

$$P = \frac{F}{\pi ab} = \frac{4}{\pi} \times \left(\frac{F}{D^2} \right)^{1/3} \times AB \left(\frac{1}{4A} + \frac{1}{4B} \right)^{4/3} \quad (15)$$

что совпадает по структуре с (7) и (13).

Итак, для двух случаев: близких и различающихся значений параметров области контакта a и b , мы получили приближенные формулы (11) и (14), позволяющие оценить сближение за счет деформации, а также формулы для давления, оказываемого на образец (13) и (15).

Из приведенных выше выкладок и оценок ясно, что уменьшение величины сил взаимодействия зонд-образец является актуальной проблемой. Возможным решением может быть адекватный выбор среды исследования. Так, при проведении АСМ исследовании в жидкости исчезают капиллярные силы, а величина Ван-дер-Ваальсового взаимодействия может быть существенно уменьшена (возможно даже изменение характера взаимодействия — возникновение дальнедействующих Ван-дер-Ваальсовых сил отталкивания). Уменьшить величину силового взаимодействия зонд-образец можно и при работе в режиме прерывистого контакта.

2. Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот

2.1 Молекулы нуклеиновых кислот

Молекулы *нуклеиновых кислот* — рибонуклеиновой (РНК) и дезоксирибонуклеиновой (ДНК) являются основными носителями генетической информации. Структурная модель молекулы ДНК была впервые предложена Уотсоном и Криком на основании анализа рентгенограмм натриевой соли этой кислоты. Согласно данной модели, молекула ДНК представляет собой две нити, закрученные в спираль, при этом каждая нить является последовательностью четырех типов звеньев (*нуклеотидов*), расположенных в определенном порядке вдоль нити (вторая нить всегда образована набором нуклеотидов, *комплиментарных* к нуклеотидам первой; т.о., вторая нить является своего рода “инвертированным” двойником первой). Последовательность нуклеотидов можно

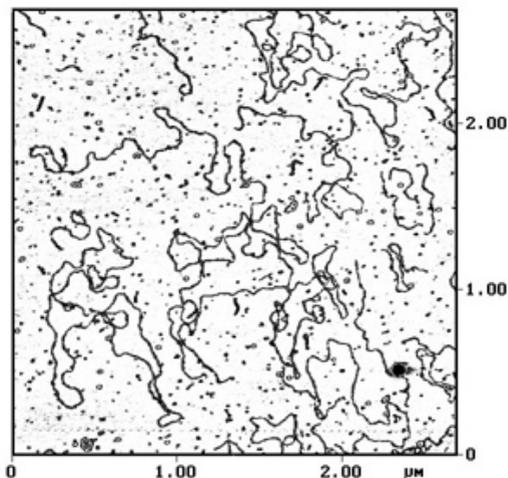


Рис. 3. Типичное АСМ-изображение молекул ДНК

рассматривать как запись информации в “четвертичном” (по числу нуклеотидов) коде. Дешифровка данного кода для различных молекул нуклеиновых кислот является важной задачей в современной молекулярной биологии.

Одним из способов частичной дешифровки кода определенной молекулы нуклеиновой кислоты является т.н. метод физического картирования с использованием маркеров. Маркерами служат *лиганды*, основным свойством которых является распознавание специфической последовательности нуклеотидов (формирующей некоторый функциональный участок) и связывание с ней. Схема “мечения” такова: в раствор, содержащий нуклеиновые кислоты, добавляются специфические лиганды (например, определенные белковые молекулы) которые связываются со своими специфическими участками молекулы нуклеиновой кислоты. Т.о. возникает система, состоящая из молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы белка, прикрепленной к ней в определенном месте. Далее, экспериментально определяется расположение участка прикрепления белка (а значит, и искомой последовательности нуклеотидов) относительно концов молекулы, строятся гистограммы распределения этого местоположения (для проверки статистической достоверности) и на основании их делается вывод о локализации анализируемого функционального участка.

Т.о., при условии, что у нас есть метод визуализации молекул нуклеиновых кислот и идентификации связанных с ней лигандов, мы можем частично дешифровать код молекулы нуклеиновой кислоты. В качестве такого метода достаточно перспективно использовать сканирующую зондовую микроскопию (особенно атомно-силовую).

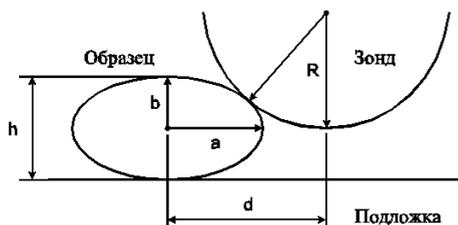


Рис. 4. К объяснению эффекта уширения — контакт зонда и образца. $2a$ — истинная ширина объекта, $2d$ — ширина профиля АСМ-изображения на полувысоте.

2.2 Специфика применения зондовой микроскопии для исследования нуклеиновых кислот

Молекула ДНК стала первым биологическим объектом, исследованным сканирующей зондовой микроскопией (см. обзор [1]). Действительно, ДНК является достаточно удобным объектом для данных исследований (то же относится и к РНК). Специфическая форма молекул — протяженная нить облегчает идентификацию их на изображении, полученном с помощью зондового микроскопа, см. рис. 3.

Более того, как известно [1], основным артефактом АСМ является эффект уширения, связанный с тем, что размеры зондирующего острия конечны (радиус кривизны кончика около 10 нм). Механизм возникновения этого эффекта проиллюстрирован на рис. 4. Элементарные геометрические построения показывают, что при визуализации объекта, имеющего в сечении окружность радиуса R' , с помощью зонда радиуса R ширина профиля (на полувысоте) АСМ-изображения объекта составит величину:

$$2d = 2\sqrt{2RR' + R'^2}. \quad (16)$$

При исследовании молекул ДНК типичные экспериментальные значения ее ширины (для режима контакта на воздухе) 10–12 нм, в то время как согласно модели диаметр молекулы составляет 2 нм. Т.о., на АСМ изображении молекула изображается в 5–6 раз более широкой, чем она есть на самом деле. Этот эффект в данном случае играет позитивную роль, поскольку облегчает идентификацию молекул на кадре, размеры которого составляют величину 100–200 мкм², при плотности записи информации — 512×512 точек. Особенно это преимущество проявляется при исследовании длинных молекул ДНК (более 15 микрон), которые могут не уместиться целиком на кадре небольшого размера.

Как уже отмечалось, при исследовании нуклеиновых кислот основной интерес вызывает анализ длины молекул, а также местоположения специальных маркеров (лигандов), отмечающих местоположение специфических последовательностей нуклеотидов относительно концов молекулы.

Для того, чтобы успешно решить эту задачу методом АСМ, необходимо адсорбировать макромолекулу нуклеиновой кислоты на поверхности твердой подложки и зафиксировать ее там в расправленном состоянии.

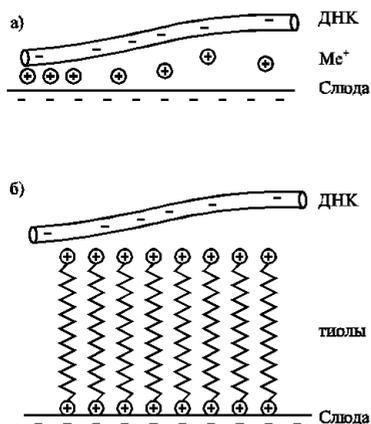


Рис. 5. Связывание макромолекулы нуклеиновой кислоты и подложки: а) ионами металлов, б) пленкой тиолов (масштаб не соблюден)

2.3 Методы фиксации макромолекул нуклеиновых кислот на подложке

Обычно в рабочих растворах буферов (в тех, в которых нуклеиновые кислоты не денатурируют) поверхность макромолекулы заряжена отрицательно. Наиболее удобная подложка для исследований АСМ это слюда. Кристаллы слюды имеют слоистую структуру и межслойным скалыванием позволяют получать поверхности значительной площади с величиной шероховатости в доли ангстрема. При нанесении капли буфера, содержащего молекулы нуклеиновых кислот, на поверхность слюды последняя также приобретает отрицательный заряд¹¹. Поэтому при высыхании капли молекулы нуклеиновых кислот, не будучи прикрепленными к подложке (этому мешает электростатическое отталкивание), увлекаются гидродинамическим потоком и частично агрегируют, затрудняя их идентификацию при исследовании.

В настоящее время разработан целый ряд методик адсорбирования расплавленных одиночных молекул ДНК на поверхность слюды. Некоторый прогресс достигнут и в разработке методик иммобилизации для молекул РНК,¹² которую сложнее зафиксировать в расплавленном состоянии.

Большинство методов фиксации нуклеиновых кислот на поверхности слюды основаны на модификации поверхности подложки (или макромолекулы) с целью нейтрализации отрицательного поверхностного заряда (или придания поверхности положительного заряда). Для этого во взаимодействующую систему образец-подложка вводят третий элемент: положительные ионы металлов, катионные поверхностно-активные вещества, мономолекулярные самоорганизующиеся пленки тиолов, силанов и пр. Все эти подходы приводят к формированию между подложкой и поверхностью заряженных связующих “мостиков” (см. рис. 5), которые прочно удерживают молекулу и в процессе сканиро-

¹¹ слюда приобретает отрицательный заряд в водных растворах вблизи нейтральных значений рН

¹² специфика одноцепочечной молекулы РНК в том, что у нее нет двойной спирали и нить молекулы стремится сохранить элементы вторичной структуры (“шпильки”, изломы и пр.), образуя спираль сама с собой

вания и при приготовлении образца (высушивании капли препарата).

При использовании гидрофобной подложки (например, пирографита) способствовать сорбции микрочастиц может *гидрофобный эффект*, сущность которого в возникновении значительных сил притяжения между гидрофобными поверхностями в водной среде¹³. Так, гидрофобный эффект улучшает сорбцию частиц вируса табачной мозаики на гидрофобную подложку (поверхность пирографита или слюды, гидрофобизированной тонкой органической пленкой), сокращая время приготовления образцов. При комплексообразовании молекул нуклеиновых кислот с молекулами поверхностно-активных веществ или белков (имеющих гидрофобные участки) гидрофобный эффект способствует адсорбции расправленных макромолекул на подложку¹⁴.

3. Экспериментальная часть

Знакомство с программой “Фемтоскан-001”

Возьмите описание программы “Фемтоскан-001” [6], позволяющей проводить анализ изображений, полученных с помощью АСМ (рабочее окно программы изображено на рис. 6), и ознакомьтесь с ним, обращая особое внимание на разделы, посвященные построению сечений (опция “section”) и измерению длин ломаных (опция “curve”). Получите зачет по данному упражнению, продемонстрировав преподавателю знакомство с основными функциями программы.

Оценка параметров зонда по анализу АСМ-изображений тест-объектов — частиц вируса табачной мозаики

В директории %PATH%\n_acids\vtm выберите файл с изображениями частиц вируса табачной мозаики (ВТМ). Для нескольких АСМ-изображений частиц ВТМ, полученных при различной силе воздействия зонда при сканировании, проведите измерения высоты профиля частицы и ширины на полувысоте. По формуле (16) оцените радиус кривизны зонда, зная, что диаметр частицы ВТМ составляет 22 нм. По формуле (14), зная величину деформации вирусной частицы при заданной величине силы сканирования, оцените модуль упругости, характеризующий белковый каркас ВТМ. По формуле (15) оцените давление, оказываемое на частицу ВТМ при сканировании. Постройте теоретический и экспериментальный графики зависимости высоты вирусных частиц от силы воздействия зонда при сканировании.

Измерение параметров АСМ-изображений макромолекул нуклеиновых кислот

Внутри директорий %PATH%\n_acids\rna или %PATH%\n_acids\dna выберите файлы с изображениями макромолекул нуклеиновых кислот. Проведите с помощью программы “Фемтоскан-001” измерения параметров: l — длины макромолекулы, d — ширины АСМ-изображения профиля макромолекулы на полувысоте и h —

¹³ есть основания полагать, что гидрофобный эффект — комплексное явление, вклад в которое в разных условиях дают различные механизмы, проявляющиеся, тем не менее, одинаково

¹⁴ комплексообразование молекул нуклеиновых кислот с тонкой пленкой молекул белков, переносимой с границы раздела фаз на гидрофобную подложку, составляет сущность широко используемого в электронной микроскопии метода Кляйншмидта

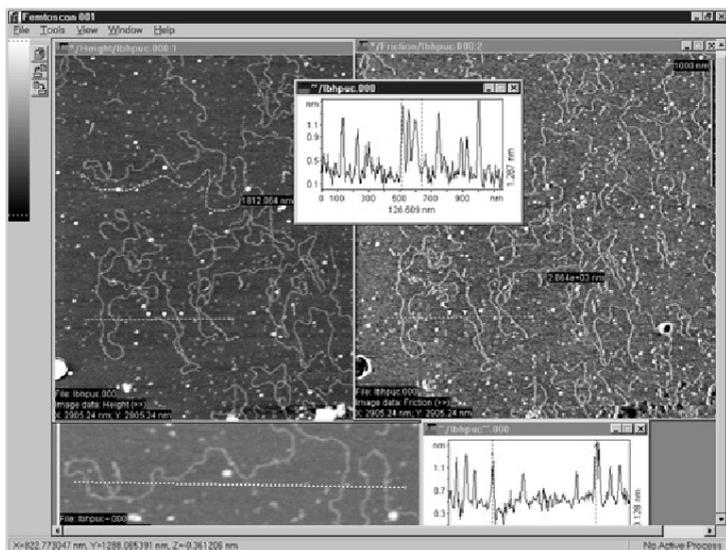


Рис. 6. Рабочее окно программы “Фемтоскан-001”

высоты АСМ-изображения над подложкой. Определите среднее значение данных параметров (проведя несколько измерений для каждого параметра при различной силе сканирования) и оцените стандартное отклонение от среднего.

Анализ и обработка полученных результатов

Согласно данным рентгеноструктурного анализа диаметр молекулы ДНК составляет 2 нм. Сравните полученные вами значения для параметров d и h и объясните наблюдаемое отличие от известных значений.

По формуле (11) оцените деформацию макромолекулы под действием зонда, зная величину приложенной силы. Оцените, при каком значении параметра E — модуля Юнга образца, наблюдается согласие с экспериментальными данными. Оцените величину давления на макромолекулу со стороны зонда, воспользовавшись формулой (13). Сравните полученные значения с теми, что получились при анализе АСМ-изображений частиц ВТМ.

Предложите методику восстановления истинной ширины объекта по его АСМ-изображению (учет эффекта уширения, проиллюстрированного на рис. 4).

Анализ распределения частично высвобожденных вирусных РНК по длинам^{*15}

Частицы вируса табачной мозаики состоят из молекулы одноцепочечной РНК, покрытой белковой оболочкой. Информация о самосборке вирусной частицы и, наоборот,

¹⁵это упражнение для желающих

о последовательном освобождении молекулы РНК от белковой оболочки важна для понимания механизма репликации вирусных частиц.

В директории %PATH%\n_acids\vtm_rna выберите файлы с АСМ-изображениями частично разрушенных частиц ВТМ с нитями РНК, выходящими из вирусных остатков. Проведите измерения длины свободных участков нитей РНК, для набранной статистики постройте соответствующую гистограмму. Определите значение максимума распределения (или нескольких максимумов, если набранная статистика позволяет их различить). Оцените погрешность в полученных значениях и сделайте вывод о точности, которую позволяет достичь метод АСМ в определении местоположения специфических участков макромолекул.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные отличия режимов работы АСМ, и расскажите о природе сигналов, которые могут быть детектированы при сканировании. Какую информацию о локальных физических и топографических особенностях поверхности несет каждый сигнал?
2. Объясните причины основных погрешностей, возникающих при исследованиях АСМ; расскажите об эффектах *уширения* и *занижения высоты объектов*. Как они могут быть учтены при восстановлении реальной геометрии поверхности?
3. Каковы основные экспериментальные проблемы, возникающие при АСМ-исследовании биообъектов? Расскажите о методиках иммобилизации биообъектов на поверхностях твердых подложек, укажите эффекты, на которых основаны эти методики.

Литература

- [1] Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров / под. ред. И.В. Яминского. М.: Научный мир, 1997, 87 с. 2, 13, 13
- [2] Б.В. Дерягин, Н.В. Чураев, В.М. Муллер, Поверхностные силы. М.: Наука, 1985, 398 с. 6
- [3] Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц, Теория упругости. М.: Наука, 1987, 246 с. 8
- [4] Физические величины, справочник. М.: Энергоатомиздат, 1991, 1231 с. 9
- [5] Г.Б. Двайт, Таблицы интегралов. М.: Наука, 1973, 228 с. 10
- [6] А.С. Филонов, И.В. Яминский, Программный пакет "Фемтоскан-001". М.: Центр перспективных технологий, 1998, 21 с. 15