

Ćwiczenie: Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Prowadzący: Michał Sarna (sarna@novel.ftj.agh.edu.pl)

I. Wstęp teoretyczny

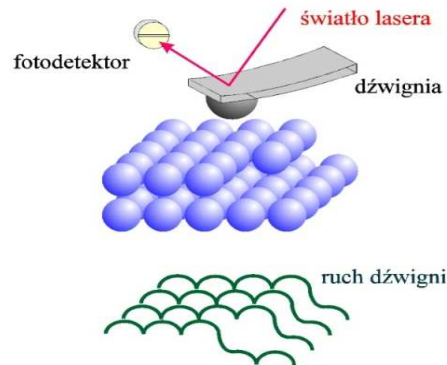
1. Wprowadzenie

Mikroskop sił atomowych AFM (*ang. Atomic Force Microscope*) jest jednym z najbardziej uniwersalnych przedstawicieli szerokiej grupy mikroskopów ze skanującą sondą SPM (*ang. Scanning Probe Microscopy*). Pierwszym przedstawicielem rodziny mikroskopów SPM był skaningowy mikroskop tunelowy STM (*ang. Scanning Tunneling Microscope*), skonstruowany w roku 1981 przez Binniga i Rohrera. Za to odkrycie autorzy zostali nagrodzeni nagrodą Nobla z fizyki w roku 1986. W tym samym roku Binnig i współpracownicy zaprezentowali kolejnego przedstawiciela mikroskopów SPM - mikroskop sił atomowych, nazywany też skaningowym mikroskopem sił SFM (*ang. Scanning Force Microscope*). Najważniejszą zaletą mikroskopu AFM jest możliwość obrazowania badanych powierzchni z atomową zdolnością rozdzielczą. W przeciwieństwie do innych mikroskopów skaningowych, mikroskop AFM może badać nie tylko przewodniki i półprzewodniki ale także izolatory. Dzięki tej właściwości można go skutecznie wykorzystywać do badania próbek biologicznych. Dodatkową zaletą mikroskopu AFM jest możliwość przeprowadzania pomiaru w cieczach, co z uwagi na charakter pomiaru umożliwia badanie żywych preparatów biologicznych w środowisku zbliżonym do naturalnego. Oprócz pomiarów topograficznych mikroskop AFM może również dostarczać informacji o właściwościach mechanicznych badanej próbki takich jak: elastyczność, siła adhezji, tarcie. Pomiary takie wykonuje się przy użyciu spektroskopii sił (*ang. force spectroscopy*) polegającej na pomiarze krzywych siła-odległość.

2. Zasada działania

Mikroskop sił atomowych nie ma nic wspólnego z "konwencjonalnymi" mikroskopami optycznymi dalekiego pola, które obrazują badany obiekt poprzez rejestrację promieniowania przechodzącego lub odbitego od próbki. Zdolność rozdzielcza takiego układu jest ograniczona dyfrakcją i wynosi ok. 200 nm. Lepszą zdolność rozdzielczą można uzyskać przy użyciu wysokoenergetycznych elektronów odbitych od powierzchni próbki (SEM) lub elektronów przechodzących przez próbkę (TEM). Wiąże się to jednak z inwazyjną preparatyką, która w przypadku "delikatnych" próbek biologicznych może doprowadzić do ich zniszczenia. Mikroskop sił atomowych do obrazowania nie wykorzystuje ani soczewek ani źródeł światła. Jedyne światło jakie AFM posiada to laser, którego wiązka skierowana jest na koniec ramienia, która po odbiciu trafia w detektor (jest to element metody detekcji ruchu ramienia). Zasada działania mikroskopu AFM polega na przemieszczaniu (skanowaniu) powierzchni próbki za pomocą cienkiego ostrza zamontowanego na sprężystym ramieniu i mierzenia ugięcia ramienia proporcjonalnego do zmian

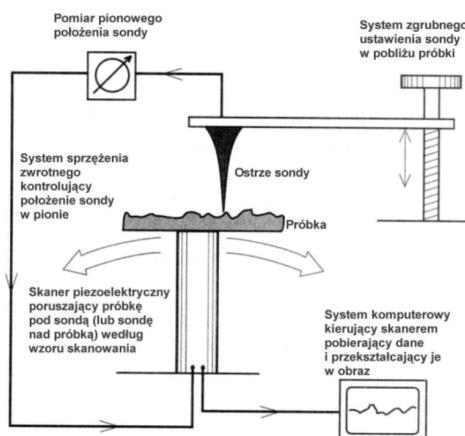
topografii powierzchni próbki (Rys.1). Ta wydawać by się mogło prosta metoda zbierania informacji o powierzchni próbki jest w stanie generować obrazy z atomową zdolnością rozdzielczą.



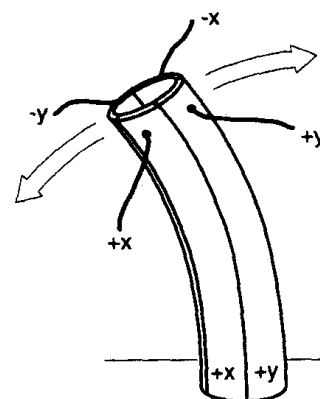
Rys. 1. Zasada działania mikroskopu AFM.

3. Budowa mikroskopu AFM

Podstawą konstrukcyjną mikroskopu AFM jest sonda składająca się z ostrza, umieszczonego na sprężystym ramieniu zamontowanej na śrubie regulującej położenie próbka-ostrze (Rys.2). W momencie kiedy mikroskop sił atomowych zacznie skanować istotne jest dokładne pozycjonowanie ostrza względem próbki. Ze względu na małą odległość pomiędzy powierzchnią próbki a ostrzem konieczne jest zastosowanie bardzo precyzyjnego układu sterowania położeniem próbki. Taką rolę pełni skaner piezoelektryczny, który pod wpływem przyłożonego napięcia, zmienia swoją geometrię - odpowiednio wydłuża się bądź skraca w kierunku przyłożonego napięcia (Rys.3). Każdy układ pomiarowy posiada odpowiednio czuły układ detekcji. Najczęściej jest to tzw. „pozycyjnie czuły detektor” oraz elektronika realizująca pętlę sprzężenia zwrotnego.



Rys. 2. Schemat przedstawiający najważniejsze elementy budowy mikroskopu AFM.



Rys. 3. Schemat budowy tuby piezoelektrycznej

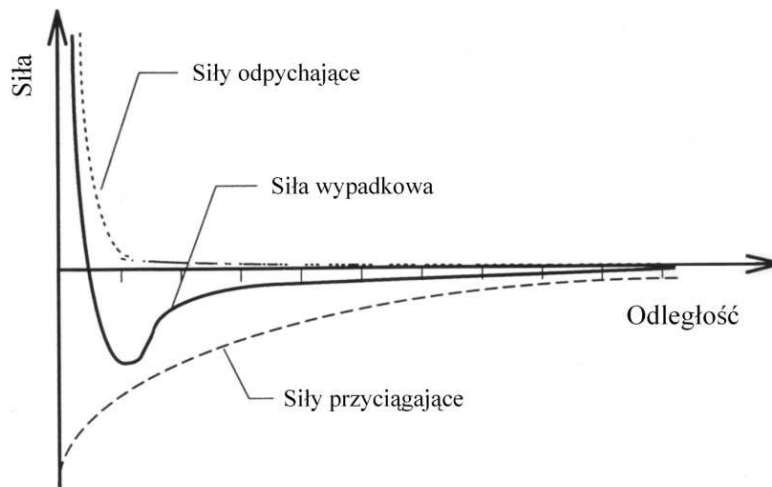
4. Podstawy fizyczne AFM-u

Rejestrowane odchylenie ramienia jest wynikiem działania sił występujących pomiędzy atomami ostrza a atomami znajdującymi się na powierzchni próbki. Decydującą rolę w tych oddziaływaniach odgrywają przyciągające siły van der Waalsa oraz krótkozasięgowe siły odpychające. Wypadkowa wartość oraz charakter (przyciągający lub odpychający) sił zależy od wzajemnej odległości próbka-ostrze (Rys.4) i jest opisywany potencjałem Lennarda-Jonesa (poniżej). Oprócz w/w sił należy uwzględnić również:

- siły kapilarne;
- oddziaływania elektrostatyczne;
- adhezja;
- siły dwuwarstwy.

$$E(r) = -\frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}},$$

gdzie: A i B to stałe zależne od oddziaływań.



Rys. 4. Zależność oddziaływania pomiędzy ostrzem a próbką w funkcji odległości.

5. Tryby pracy mikroskopu AFM

W związku z charakterem oddziaływania zależnym od odległości próbka-ostrze, wyróżnia się następujące tryby pracy mikroskopu sił atomowych:

- tryb kontaktowy (*ang. contact mode*);
- tryby bezkontaktowe (*ang. non-contact modes*).

Podczas pracy w trybie kontaktowym, pomiędzy ostrzem a próbką dominują siły odpychające. Ostrze (o niskiej stałej sprężystości) znajduje się w kontakcie z powierzchnią próbki. Siły kontaktowe (rzędu nanoniutonów) powodują wygięcie dźwigni, proporcjonalnie do zmian topografii badanej próbki. Informację o badanej powierzchni można uzyskać bezpośrednio z detekcji ruchu ramienia (mikroskop pracuje wtedy w trybie kontaktowym stałej wysokości) lub z ruchów piezoelementu (mikroskop pracuje wtedy w trybie kontaktowym stałej siły). W pierwszym przypadku ramię podczas skanowania naciska na próbkę z różną siłą zależną od topografii powierzchni, natomiast skaner utrzymuje próbkę na tej samej wysokości. Wadą takiego rozwiązania jest to, że w każdym punkcie podczas skanowania ostrze naciska z różną siłą co może doprowadzić do zniszczenia próbki. W drugim przypadku utrzymywane jest stałe ugięcie ramienia co powoduje, że mikroskop w każdym punkcie naciska z tą samą siłą nie niszcząc próbki. Wadą trybu kontaktowego jest fakt iż nie da się wyeliminować sił bocznych, które „szarpiąc” próbkę podczas skanowania mogą doprowadzić do jej oderwania. Siły boczne da się wyeliminować stosując jeden z trybów bezkontaktowych.

Tryb bezkontaktowy obejmuje obszar działania sił przyciągających. Siły działające między ostrzem a próbką są mniejsze niż w przypadku trybu kontaktowego (rzędu pikoniutonów). W trybie bezkontaktowym dźwignia o dużej stałej sprężystości znajduje się w odległości od 10 do 100 nm nad powierzchnią próbki. Dodatkowo wprowadzana jest w drgania z częstością bliską częstości rezonansowej. Podczas zbliżania się sondy do powierzchni próbki rejestrowana jest zmiana amplitudy drgań dźwigni. Mikroskop aby utrzymać zadaną amplitudę reaguje zmianą położenia próbki (skaner piezoelektryczny odpowiednio się wychyla) „budując” w ten sposób punkt po punkcie topografię powierzchni próbki. Tryb przerywanego kontaktu podobnie jak tryb bezkontaktowy oparty jest na ruchu drgającym ramienia nad próbką z tak dobraną amplitudą, że samo ostrze „dziobie” powierzchnię badanej próbki. Tak jak w trybie bezkontaktowym, utrzymywanie stałej amplitudy drgań dźwigni poprzez pętlę sprzężenia zwrotnego powodować będzie generowanie obrazka badanej próbki. Unika się w ten sposób uszkodzeń próbki związanych z tarciem i szarpaniem jej powierzchni przez ostrze.

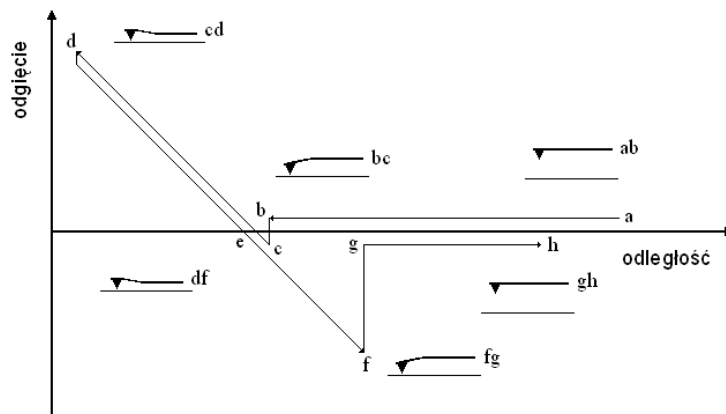
6. Zastosowania mikroskopu AFM

Mikroskop sił atomowych znajduje szerokie zastosowanie w biologii, a także w naukach pokrewnych takich jak: biofizyka, inżynieria biomedyczna, nanobiotechnologia, itd. Do najbardziej popularnych badań w których wykorzystuje się mikroskop AFM należą:

- pomiary topograficzne;
- określanie właściwości mechanicznych:
 - elastyczność
 - siła adhezji
 - tarcie
- spektroskopia pojedynczych molekuł;

7. Pomiar właściwości mechanicznych za pomocą mikroskopu AFM

Mikroskop sił atomowych oprócz pomiarów topograficznych może również dostarczać informacji o właściwościach mechanicznych badanej próbki takich jak: elastyczność, siła adhezji, tarcie. Pomiarzy takie przeprowadzane są przy użyciu spektroskopii sił (*ang. force spectroscopy*) polegającej na rejestracji krzywych siła-odległość (Rys.5). Krzywe reprezentują oddziaływanie pomiędzy ostrzem, a powierzchnią próbki. Po uzyskaniu kontaktu z próbką, ramię wygina się deformując powierzchnię próbki. Siła z jaką ostrze działa na powierzchnię próbki oraz głębokość penetracji w głąb próbki są zadawane tak aby uzyskać odpowiednie odkształcenie. Przeprowadzając pomiary można zebrać mapę krzywych pokrywających całą powierzchnię próbki. Następnie krzywe te poddaje się odpowiedniej analizie aby uzyskać informacje o właściwościach mechanicznych badanego obiektu.



Rys. 5. Schemat teoretycznej krzywej opisującej zależność pomiędzy wychyleniem ramienia a odległością od próbki.

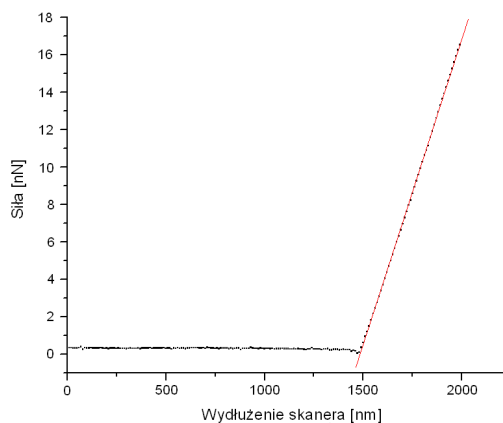
II. Przebieg ćwiczenia

- Kolokwium z części teoretycznej (I: 1-7);
- Oglądnięcie pod mikroskopem optycznym próbek, które następnie zostaną zanalizowane mikroskopem AFM;
- Prezentacja mikroskopu AFM - omówienie poszczególnych elementów budowy mikroskopu;
- Pomiar topografii próbki;
- Pomiar właściwości mechanicznych próbki;
- Omówienie uzyskanych wyników.

III. Opracowanie danych

Po otrzymaniu danych od prowadzącego należy opracować wyniki w następujący sposób. Analiza danych polega na przeliczeniu otrzymanych wartości pomiarowych w oparciu o model Hertza (rozszerzony przez Sneddon) odkształceń elastycznych. Po dokonaniu takiej analizy otrzymuje się wartość modułu elastyczności (tzw. Moduł Younga) dla badanego materiału.

Krzywe siła-odległość uzyskane bezpośrednio z mikroskopu AFM przedstawiają zależność napięcia na fotodiodzie U odpowiadającego zmianie położenia dźwigni w funkcji pionowego wydłużenia skanera piezoelektrycznego. Aby uzyskać krzywe przedstawiające zależność siły od wydłużenia skanera należy dokonać kalibracji czyli przeliczenia napięcia na siłę. W tym celu wykorzystuje się liniowy fragment krzywej dla zależności odległość od napięcia mierzonej w kontroli (tj. wybranym miejscu na szkiełku, plastiku, itd.). Parametr kierunkowy a prostej dopasowanej do krzywej odległość-napięcie wykorzystywany jest do przeliczenia napięcia na siłę wg. poniższego wzoru:

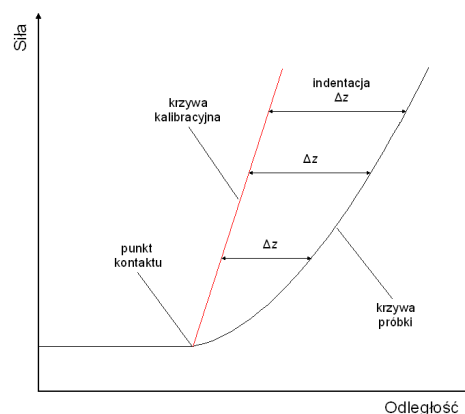


Rys. 6. Przykładowa krzywa kalibracyjna.

$$F[N] = a \left[\frac{\mu m}{V} \right] \cdot k \left[\frac{N}{m} \right] \cdot U[V] \cdot 10^{-6},$$

gdzie k to stała sprężystości używanego ostrza.

Właściwości elastyczne badanego materiału określa charakterystyczna dla danego materiału zależność pomiędzy indentacją Δz a siłą nacisku F . Dla idealnie twardego materiału indentacja wynosi zero. W praktyce mamy jednak do czynienia z materiałami odkształcalnymi (np. komórki). Kolejnym etapem analizy danych jest wyliczenie funkcji indentacji. Zależność pomiędzy siłą nacisku a indentacją jest wyznaczana jako różnica położenia skanera odpowiadająca tej samej wartości siły dla próbki badanej i referencyjnej (Rys. 7).



Rys. 7. Schemat wyznaczania indentacji.

Do tej zależności dopasowywana jest funkcja w postaci:

$$F(\Delta z) = A \cdot \Delta z^2.$$

Na podstawie znajomości parametru A moduł elastyczności wyznaczany jest wg. poniższego wzoru:

$$E_k = \frac{\pi(1 - \mu_k^2)}{2tg\alpha} A,$$

gdzie: E_k jest modułem Younga komórki, μ_k to współczynnik Poissona komórki (przyjmujemy jego wartość równą 0.5) a α jest kątem rozwarcia ostrza (przyjmujemy 25°).