

06;14;15

## **Об инверсии контраста при визуализации гидрофильных поверхностей методом силовой микроскопии с использованием зондов на основе Pt/C-вискеро**

© М.В. Жуков<sup>1</sup>, И.С. Мухин<sup>1,2</sup>, В.В. Левичев<sup>1</sup>, А.О. Голубок<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург  
E-mail: cloudjyk@yandex.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Академический университет — научно-образовательный центр нанотехнологий РАН

<sup>3</sup> Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Поступило в Редакцию 12 сентября 2014 г.

Проведено сравнение пространственного разрешения и контраста на изображениях поверхности эритроцитов, полученных методом сканирующей силовой микроскопии (ССМ) при использовании стандартных гидрофобных Si-зондов и зондов, модифицированных гидрофильными Pt/C-нановискерами. Показано, что зонды с Pt/C-нановискерами обеспечивают более высокое пространственное разрешение и контраст при визуализации нанорельефа на поверхности эритроцитов. Обнаружена инверсия контраста на отдельных участках ССМ-изображений при замене Si-зондов на зонды с Pt/C-нановискерами. Обсуждается природа инверсии контраста, наблюдаемой как в полуконтактном, так и в контактном режимах.

Известно, что пространственное разрешение и контраст изображений поверхности образцов, получаемых методом сканирующей силовой микроскопии (ССМ), обусловлены зависимостью силы взаимодействия между зондом и исследуемым образцом от координат, которая в основном складывается из упругих сил и силы адгезии зонда к поверхности образца. При этом в экспериментах, проводимых в воздушной среде, необходимо учитывать появление добавочных капиллярных сил, зависящих от степени гидрофильности (гидрофобности) поверхности зонда и образца. Поскольку сила взаимодействия между зондом и образцом представляет собой свертку геометрической формы и физических свойств зонда и образца, то пространственное разрешение, контраст

и соответствие получаемых ССМ-изображений реальному рельефу поверхности образца во многом определяются геометрической формой и физическими свойствами используемых зондов.

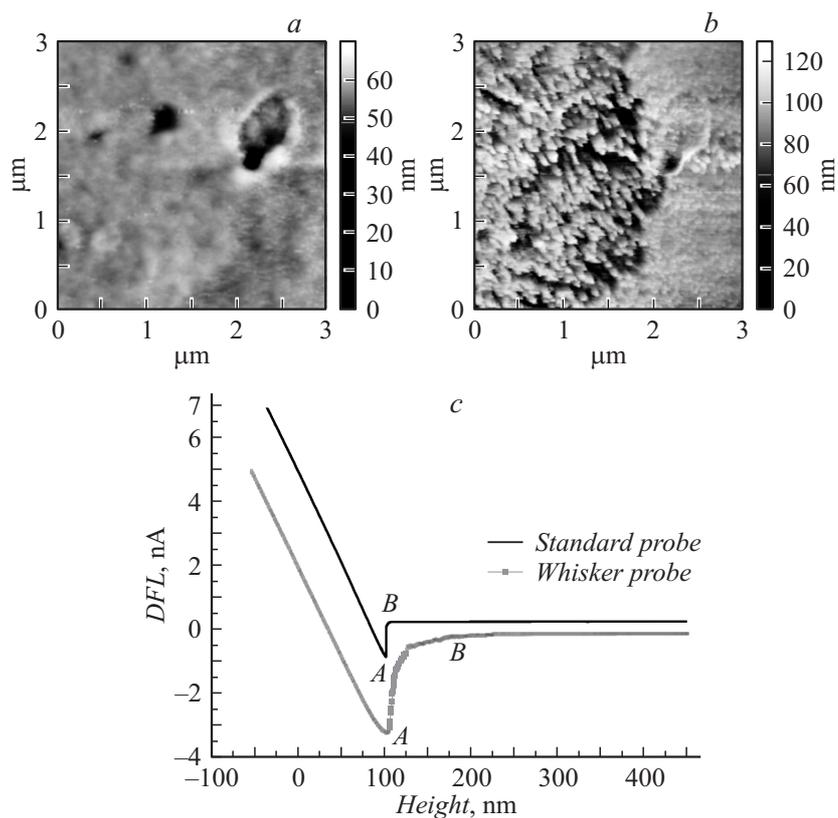
Для улучшения пространственного разрешения и повышения точности визуализации сложного рельефа на вершинах стандартных Si-кантилеверов локализуют нанотрубки [1,2], алмазоподобные углеродные [3] и металл-углеродные вискеры [4], а для визуализации и характеристики мягких объектов — коллоидные наносферы калиброванного диаметра [5]. Для правильной интерпретации изображений, получаемых методом ССМ, необходимо принимать во внимание детали взаимодействия зонда с исследуемой поверхностью. В [6–9] исследовалось влияние гидрофобности (гидрофильности) поверхностей зонда и образца на ССМ-данные, а в [10–12] обсуждаются артефакты и эффект инверсии контраста, наблюдаемый в резонансных (полуконтактном и бесконтактном) силовых режимах.

В данной работе на примере исследования поверхности эритроцитов в контактном и полуконтактном ССМ-режимах проведено сравнение результатов, получаемых с помощью стандартных гидрофобных Si-кантилеверов и кантилеверов с одиночными гидрофильными Pt/C-нановискерами на вершине Si-пирамидки.

Нановискеры формировались на вершинах Si-кантилеверов NSG01 (NT-MDT) с помощью осаждения Pt/C-материала под действием сфокусированного электронного пучка в присутствии газов-прекурсоров в камере электронного микроскопа Cross Beam Neon (Carl Zeiss) [4,13]. Использовались кантилеверы с жесткостью (1.5–2.5) N/m, что обеспечивало неразрушающую визуализацию клеточных мембран.

Длина  $L$  и диаметр  $D$  нановискеров лежали в диапазоне 0.8–1.2 и 30–40 nm соответственно, т.е. аспектное отношение  $L/D$  имело значение 20–40. Угол между осью нановискера и осью пирамиды кантилевера составлял  $\sim 20^\circ$  и определялся углом наклона плоскости кантилевера к плоскости исследуемого образца в сканирующем зондовом микроскопе Ntegra Aura (NT-MDT). При такой геометрии ось вискера располагается перпендикулярно поверхности образца, что обеспечивает его максимальную механическую устойчивость в силовом режиме [4]. Радиус кривизны поверхности вершины вискера имел величину около 10 nm, совпадающую с соответствующим радиусом кривизны поверхности острия пирамиды используемых кантилеверов.

Как показано нами ранее [4], такие зонды при одинаковом заострении за счет высокого аспектного отношения имеют преимущества



**Рис. 1.** ССМ-изображения фрагмента мембраны эритроцита, полученные: *a* — стандартным Si-кантилевером, *b* — Si-кантилевером с Pt/C-вискером на вершине, *c* — кривые отвода для стандартного Si-зонда и зонда с Pt/C-вискером к поверхности эритроцита.

по сравнению со стандартными Si-кантилеверами при визуализации субмикронного рельефа на поверхности твердого тела с резкими перепадами по высоте.

Объектом данного исследования была поверхность эритроцитов крови [14], нанесенных на покровное стекло. На рис. 1, *a, b* представлены ССМ-изображения одного и того же места на поверхности эритроцита, полученные при одинаковых рабочих параметрах в полуконтактном си-

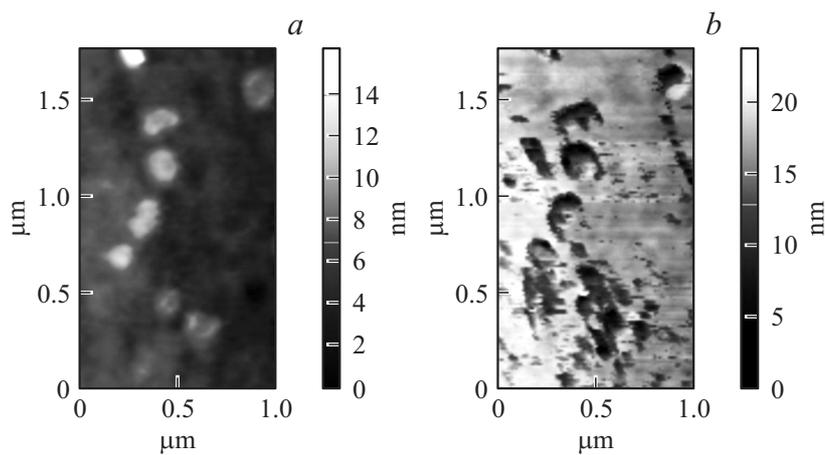
ловом режиме с помощью стандартного Si-кантилевера и аналогичного кантилевера с локализованным на его вершине Pt/C-нановискером.

Как видно из представленных на рис. 1 изображений, кантилевер с Pt/C-нановискером существенно улучшает контраст и разрешающую способность ССМ по сравнению со стандартным кантилевером, позволяя визуализировать тонкую структуру на поверхности эритроцитов в субмикронном диапазоне, которую стандартным зондом обнаружить не удастся.

Для всех исследуемых зондов были измерены кривые подвода/отвода к поверхности эритроцита без модуляции расстояния между зондом и образцом, при этом силы адгезии оценивались по кривым отвода (рис. 1, *c*) при одинаковой влажности и температуре окружающей среды. Эксперимент проводился следующим образом: вначале проводились измерения с использованием стандартного Si-зонда, затем на вершине этого зонда формировался одиночный Pt/C-нановискер и в тех же участках на поверхности образцов проводились повторные измерения. Исследования, выполненные с использованием нескольких кантилеверов, показали, что адгезия (расстояния между точками *A* и *B* на кривых отвода на рис. 1, *c*) зондов с Pt/C-вискерами в 2–3 раза превышает адгезию Si-зондов.

Липидный бислой на поверхности эритроцитов, как известно, имеет гидрофильные свойства и при экспериментах на воздухе покрыт тонким слоем воды. Поэтому наблюдаемое различие в силах адгезии свидетельствует о гидрофильности зондов с Pt/C-вискерами, в отличие от Si-зондов, всегда покрытых гидрофобным слоем окисла. Детальный анализ ССМ-изображений показывает, что при использовании Si-зонда на отдельных участках поверхности эритроцита наблюдаются нанометровые выступы, причем при замене Si-зонда на зонд с Pt/C-вискером данные нановыступы инвертируются в нанопоры (рис. 2). Отметим, что в наших экспериментах такая инверсия контраста наблюдалась как в полуконтактной, так и в контактной силовых модах.

При малой силе взаимодействия, которую обычно используют для неразрушающей визуализации биологических объектов, гидрофобный зонд не может проникнуть сквозь поверхностный слой воды и достигнуть исследуемой поверхности образца. Гидрофобный зонд лишь описывает поверхность образца, покрытую слоем воды. Гидрофильный Pt/C-вискер, наоборот, притягиваясь к поверхности образца сильнее, чем Si-зонд, проникает сквозь слой воды, что обеспечивает



**Рис. 2.** Инверсия контраста на ССМ-изображениях поверхности эритроцита, полученных с использованием зондов различных типов: *a* — стандартного Si-зонда, *b* — зонда с Pt/C-нановискером.

ССМ-визуализацию истинного рельефа поверхности. Проникновению зонда с нановискером через слой воды также способствует его высокое аспектное отношение по сравнению со стандартным Si-зондом. Это хорошо согласуется с тем фактом, что нановискер, имея одинаковый со стандартным зондом радиус кривизны поверхности острия, обеспечивает существенное улучшение пространственного разрешения при визуализации поверхности эритроцита (рис. 1). Поэтому наблюдаемую с помощью Pt/C-вискера тонкую структуру на поверхности эритроцита (рис. 1, *b*) можно связать с белковыми глобулами, встроенными в липидный бислой клеточной мембраны [15].

Следует отметить, что наблюдаемый в наших экспериментах эффект инверсии контраста (рис. 2) был известен ранее. В [10–12] сообщается об артефактах при визуализации перепада высот на поверхности образцов (вплоть до инверсии контраста) в измерительных режимах, использующих стандартные осциллирующие на резонансной частоте Si-кантилеверы. В [10,11] артефакты в контрасте наблюдались в полуконтактной моде при атмосферном давлении при визуализации пленок Лэнгмюра-Блоджетт, протеинов или молекул ДНК в режиме постоянной силы (при постоянной величине демпфирования амплитуды колебаний

кантилевера). Авторы [10–12] связывают возникновение артефактов со сложными нелинейными колебаниями кантилевера или присутствием дополнительного фазового сдвига, возникающего под действием дополнительных сил притяжения, вызванных адгезией кантилевера к поверхности образца. Отметим, что во всех случаях инверсия контраста наблюдалась только в резонансных силовых модах.

В отличие от [10–12], в данной работе наблюдалась инверсия контраста при замене гидрофобного зонда на гидрофильный, причем эффект наблюдался не только в резонансном полуконтактном режиме, но и в контактном режиме, когда колебания зонда вообще отсутствуют. Последнее обстоятельство указывает на то, что в нашем случае инверсия контраста может быть связана с капиллярной конденсацией влаги нанопорами и наноканалами на поверхности образца.

Таким образом, экспериментально продемонстрировано, что стандартные Si-кантилеверы и кантилеверы с Pt/C-вискерами, имеющие одинаковые радиусы закругления вершин, дают разные результаты при визуализации наноструктур при атмосферном давлении в полуконтактном и контактном силовых режимах. При интерпретации ССМ-данных, полученных при атмосферном давлении в полуконтактном и контактном силовых режимах с использованием стандартных Si-кантилеверов, необходимо принимать во внимание возможную инверсию контраста, связанную с конденсацией паров воды в наноканалах и нанопорах на гидрофильных поверхностях.

Авторы выражают благодарность А.В. Анкудинову за помощь в подготовке оборудования, а также О.Д. Белоусовой за предоставление образцов эритроцитов для проведения экспериментов.

Работа выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01), Российского фонда фундаментальных исследований, программы УМНИК.

## Список литературы

- [1] *Ashiri I., Gartsman K., Cohen S.R., Tenne R.* // AIP Conf. Proc. 2003. V. 685. P. 545–549.
- [2] *Kucukyildirim B.O., Eker A.A., Eker B.* // International J. Arts and Sciences. 2009. V. 3(1). P. 18–26.
- [3] *Klinov D., Magonov S.* // Appl. Phys. Lett. 2004. V. 84(14). P. 2697–2699.

- [4] Левичев В.В., Жуков М.В., Мухин И.С., Денисюк А.И., Голубок А.О. // ЖТФ. 2013. Т. 83. В. 7. С. 115–120.
- [5] Няшиев И.А., Анкудинов А.В., Стовяга А.В., Трофимова Е.Ю., Еропкин М.Ю. // ЖТФ. 2012. Т. 82. В. 10. С. 109–116.
- [6] Чуланов А.П., Зиганишина С.А., Лебедев Д.В., Бухараев А.А. // Сборник трудов XI Международного симпозиума „Нанопизика и наноэлектроника“. Нижний Новгород, 2007. С. 520–521.
- [7] Liu V.H., Chen C.-H. // Ultramicroscopy. 2011. V. 111. P. 1124–1130.
- [8] Feng X., Kieviet B.D., Song J., Schon P.M., Vancso G.J. // Applied Surface Science. 2013. V. 292. P. 107–110.
- [9] Mierczynska-Vasilev A., Beattie D.A. // J. Colloid and Interface Science. 2010. V. 344. P. 429–437.
- [10] Van Noort S.J.T., Van der Werf K.O., Grooth B.G.D., Van Hulst N.F., Greve J. // Ultramicroscopy. 1997. V. 69. P. 17–27.
- [11] Kühle A., Sorensen A.H., Zandbergen J.B., Bohr J. // Appl. Phys. A. 1998. V. 66. P. 329–332.
- [12] Rahe P., Bechstein R., Schutte J., Ostendorf F., Kühnle A. // Phys. Rev. B. 2008. V. 77. P. 195410(6).
- [13] Мухин И.С., Мухин М.С., Феклистов А.В., Голубок А.О. // Научное приборостроение. 2011. Т. 21. № 3. С. 23–29.
- [14] Белоусова О.Д., Гайдаш А.А., Толмачев И.А., Ивченко Е.В., Голубок А.О., Левичев В.В., Мухин И.С., Жуков М.В., Белоусов И.С., Ткачук И.В. // Военно-медицинский журнал. 2013. Т. CCCXXXIV. № 1. С. 19–24.
- [15] Thimm J., Mechler A., Lin H., Rhee S., Lal R. // J. Biol. Chem. 2004. V. 280 (11). P. 10646–10654.