

Zobrazování biologických struktur užitím mikroskopie atomárních sil

Biologic Structure Projection Using Atomic Force
Microscopy

Bc. Tomáš Vaculka

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta aplikované informatiky

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš VACULKA**
Osobní číslo: **A10862**
Studijní program: **N 3902 Inženýrská informatika**
Studijní obor: **Bezpečnostní technologie, systémy a management**

Téma práce: **Zobrazování biologických struktur užitím
mikroskopie atomárních sil**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Seznamte se s možnostmi užití mikroskopu atomových sil v laboratoři UTB.
3. Vyberte vhodný biologický objekt pro zobrazení pomocí mikroskopu atomových sil.
4. Provedte analýzu takto získaných obrazů a navrhněte další možnosti využití.
5. Rozeberte možnosti využití mikroskopu v bezpečnostní problematice.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. **HAWKES, Peter W; SPENCE, John C.** Science of microscopy. New York : Springer, 2007. xviii, 747 s. ISBN 9780387252964.
2. Firemní literatura fy Agilent technologies.
3. **SMOLINER J., HUBER H. P., HOCHLEITNER M., MOERTELMAIER M. AND KIENBERGER F.**, Scanning microwave microscopy/spectroscopy on metal-oxide semiconductor systems, J. Appl. Phys. 108, 064315 (2010); doi:10.1063/1.3482065.
4. **Scheuring S., Lévy D., Rigaud J. L.**, Watching the components of photosynthetic bacterial membranes and their in situ organisation by atomic force microscopy, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, Volume 1712, Issue 2, 1 July 2005, Pages 109–127, ISSN 0005–2736, 10.1016/j.bbamem.2005.04.005.
5. **KUBÍNEK, Roman, Milan VŮJTEK a Miroslav MAŠLÁŇ.** UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Mikroskopie skenující sondou. Olomouci, 2003, 105 s. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/mss/mss.pdf>.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Milan Navrátil, Ph.D.
Ústav elektroniky a měření

Datum zadání diplomové práce:

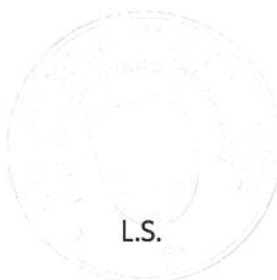
24. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2012

Ve Zlíně dne 24. února 2012

prof. Ing. Vladimír Vašek, CSc.
děkan



doc. RNDr. Vojtěch Křesálek, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se věnuje zobrazování biologických materiálů pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). V první části jsem se zaměřil na vývoj AFM a jeho využití pro zkoumání biologických materiálů. V další části popisuji funkci AFM, složení AFM mikroskopu, režimy snímání a další přídatné módy. Dále zde zmiňuji, jaké síly mohou ovlivnit měření. Výsledné zobrazení mohou zkreslovat artefakty, kterým věnuji jednu kapitolu. V samostatné části se věnuji zkoumání krevní buňky, které může sloužit jako návod pro měření. V závěru teoretické části popisuji možné aplikace AFM v bezpečnostní oblasti. Praktická část popisuje zobrazení vybraných biologických materiálů. Dále zde popisuji použitý AFM mikroskop, vybavení a postup, jak jsem se dostal k naměřeným výsledkům.

Klíčová slova: AFM, mikroskopie atomárních sil, mikroskopie skenující sondou, biologické materiály, nosník, hrot, kontaktní režim, bezkontaktní režim, pokleповý režim, artefakty

ABSTRACT

This dissertation thesis describes imaging biological structures using atomic force microscopy (AFM). First part focused on development AFM and its application to study biological materials. Next part describes a function of AFM, composition of AFM microscope, scanning modes and additional modes. Furthermore I mention what forces can affect measurements. The resulting views can interfere with the artifacts, which I devote one chapter. In separate part I deal with examining the blood cells, that can serve as guide for measurement. In conclusion theoretical part I describe possible applications of AFM in security area. Practical part describes views of chosen biological materials. There also I describe used AFM microscope, equipment and procedure, how I make to measured results.

Keywords: AFM, atomic force microscopy, scanning probe microscopy, biological samples, cantilever, tip, contact mode, non-contact mode, semi-contact mode, artifacts

Rád bych poděkoval panu Ing. Milanu Navrátilovi, Ph.D. za zasvěcení do problematiky AFM, poskytnutí studijních materiálů a za pomoc při měření v laboratoři. Dále pak děkuji rodině a přátelům za psychickou podporu, kterou mi poskytly během psaní diplomové práce.

„Prvním krokem na cestě ke štěstí je učení se.“

Dalajlama

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k prezenčnímu nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen v příruční knihovně Fakulty aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....
podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VÝVOJ MIKROSKOPIE SKENUJÍCÍ SONDOU PŘI ZOBRAZOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ	12
1.1 BIOLOGICKÝ VÝZKUM BUDOUCNOSTI	13
1.2 VÝVOJ AFM	14
1.2.1 Zobrazování pomocí AFM: Kontaktní režim	14
1.2.2 Zobrazování pomocí AFM: Dynamický nebo AC AFM režim	14
1.2.3 Skenování vzorkem vs Skenování nosníkem	17
1.2.4 AFM jako výzkumný nástroj	18
1.2.5 AFM spektroskopie sil	20
1.2.6 Microarray analýza pomocí AFM	24
1.3 SHRNUTÍ	25
2 AFM	26
2.1 VÝHODY A NEVÝHODY POUŽITÍ AFM	26
2.2 SLOŽENÍ AFM MIKROSKOPU	27
2.2.1 Hrot a nosník	27
2.2.2 Skener	29
2.2.3 Fotodioda	30
2.3 SÍLY UPLATŇUJÍCÍ V AFM	31
2.3.1 Měření a používané režimy v AFM	32
2.3.1.1 Kontaktní režim	32
2.3.1.2 Bezkontaktní režim	34
2.3.1.3 Poklepový režim	34
2.3.2 Spektroskopie sil	35
2.3.3 F-d křivka	36
2.4 DALŠÍ ZOBRAZOVACÍ MÓDY	38
2.4.1 SMM	38
2.4.1.1 Nastavení	40
2.4.1.2 Princip	40
2.4.1.3 Experimenty	41
2.4.1.4 Shrnutí	44
2.4.2 Režim MAC	45
2.4.3 Režim MAC III	46
2.4.4 Akustický AC	46
2.4.5 Snímání proudu	47
2.4.6 Modulace síly	48
2.4.7 Fázové zobrazování	49
2.4.8 Pulsující síla	50
2.4.9 Mikroskopie elektrostatických sil	51
2.4.10 Mikroskopie magnetických sil - MFM	52
2.4.11 Mikroskopie bočních sil	53

2.4.12	STM.....	54
2.5	ARTEFAKTY.....	55
2.5.1	Zrcadlení hrotu, konvoluce	55
2.5.2	Ovlivnění signálu zpětnou vazbou	56
2.5.3	Šum	56
2.5.4	Rigidita vzorku.....	57
2.5.5	Vady nosníku a hrotu	57
2.5.6	Nabíjení vzorku.....	57
2.5.7	Interference.....	58
3	ZKOUMÁNÍ LIDSKÉ KREVNÍ BUŇKY.....	59
3.1	PŘÍPRAVA VZORKU	59
3.2	METODY ZKOUMÁNÍ.....	59
3.3	VÝSLEDKY ZKOUMÁNÍ	60
3.4	SHRnutí.....	63
4	VYUŽITÍ AFM V BEZPEČNOSTNÍ OBLASTI.....	64
4.1	ANALÝZA DOKUMENTŮ	64
4.2	ZÍSKÁNÍ OTISKU PRSTU Z NÁBOJNICE.....	66
4.3	POROVNÁVÁNÍ DŮKAZNÍCH MATERIÁLŮ	67
4.4	URČENÍ STÁŘÍ KRVE	67
II	PRAKTICKÁ ČÁST	68
5	ZOBRAZENÍ BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ.....	69
5.1	VÝBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	69
5.2	PŘÍPRAVA VZORKU	70
5.3	MĚŘICÍ APARATURA	71
5.4	NASTAVENÍ PROGRAMU.....	73
5.4.1	Nastavení programu pro SMM skenování	74
5.4.2	Nastavení frekvence mikrovlnného signálu	75
5.4.3	Nastavení dC/dV controler modulu.....	77
5.4.4	Nastavení SMM kontaktního módu	79
5.5	VÝSLEDKY MĚŘENÍ	81
	ZÁVĚR	84
	ZÁVĚR V ANGLIČTINĚ.....	85
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	86
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	89
	SEZNAM OBRÁZKŮ	91
	SEZNAM TABULEK.....	95

ÚVOD

Když se řekne mikroskop, myslíme optický nebo elektronový. Dříve se používala série optických čoček pro zvětšení až 1000x. U elektronového mikroskopu byly nahrazeny fotony za elektrony a čočky optické za elektromagnetické. Tím se rozvinula mikroskopie a obraz mohl být zvětšen až 100 000x. Ale obě metody vytvářely jen dvourozměrný obraz.

S dalším vývojem přišla atomová mikroskopie. Dokáže zvětšit vzorek až 1 000 000x ve všech třech rovinách (x , y – horizontálně a z - vertikálně). AFM využívá kombinaci principů STM a metod pro měření nerovnosti povrchu. Tato relativně nová metoda je používána v elektronice, telekomunikaci, biomedicíně, chemickém a membránovém průmyslu. Zkoumané materiály mohou být tenké nebo tlusté nátěry, keramika, kompozity, skla, syntetické a biologické membrány, kovy, polymery nebo polovodiče. AFM je rovněž používá pro studium jevů, jako jsou broušení, adheze, čištění, koroze, leptání, tření, mazání, pokovování a leštění.

AFM může zobrazit podrobné informace o stavu povrchu ve vzduchu i v kapalině. I drobné rozdíly, které nejsou normálně vidět, můžeme zobrazit pomocí AFM. Je možné rozlišit jednotlivé atomy v zorném poli větším jak 125 μm . Tato kombinace jemných detailů vytváří v trojrozměrném pohledu důležitou kvantitativní analýzu dat (jako jsou rozměry prvků, drsnost povrchu a průřez ploch).

V roce 1981, G. Binnig a H. Rohrer z výzkumné laboratoře IBM v Ruschlikonu, vynalezli nový typ zobrazovacího přístroje s názvem mikroskopie tunelovacího proudu (STM) a získali za to Nobelovu cenu v roce 1986. Nejvýznamnější funkcí je velmi vysoké prostorové rozlišení v řádech 0,01 nm a dokonce lze manipulovat s jednotlivými atomy. Hlavní rozdíl mezi touto technikou a technikami výše uvedenými je, že nejsou potřeba žádné čočky, zdroje světla ani elektronů. Mikroskopie je založena na monitorování proudu, který protéká mezi vodivým hrotem a vodivým vzorkem, aniž by byly v přímém mechanickém styku. Mezi oběma kovy se vytváří energetická bariéra, kterou elektrony dle klasické teorie nemohou proniknout. Z hlediska kvantové interpretace však pravděpodobnost průchodu není nulová, ale znatelných hodnot nabývá teprve pro velmi úzké bariéry. Tím, že skenování hrotem bude probíhat za konstantního proudu nebo konstantní vzdálenosti bariéry, bude záznam z vertikálního pohybu hrotu promítat topografii povrchu.

Úspěch této techniky dal možnost vzniknout nové skupině nástrojů, souhrnně označované mikroskopie skenující sondou (SPM). Každý typ téhle skupiny má jiný druh interakce mezi hrotem a vzorkem. Nejpopulárnější z nich jsou STM, AFM a SNOM. Princip SPM je podobný jako u gramofonu. Ostrý hrot (např. nitrid křemíku v AFM, diamant u gramofonu) je veden přes povrch (vzorku nebo desky). Interakce hrotu s povrchem je změřena a převedena na elektrický signál, který je zpracován na použitelné výsledky (trojrozměrný obraz vzorku nebo hudba z reproduktorů). Nicméně, na rozdíl od gramofonu, snímání hrotem AFM je rastrování po vzorku (podobně jako tvorba televizního obrazu), než jako pohyb po spirálovité předem definované trase. Kromě jednoduchého topografického snímání mají mnoho moderních AFM schopnost zobrazit třecí síly, fázový kontrast nebo pružnost. Elektrostatické, magnetické a termovizní snímání lze taky provést s příslušným vybavením.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝVOJ MIKROSKOPIE SKENUJÍCÍ SONDOU PŘI ZOBRAZOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ

Přibližně před třiceti lety Gerd Binning a Heinrich Rohrer zveřejnili snímky z jejich nového vynálezu, skenující tunelová mikroskopie (STM), jež byla první mikroskopií skenující sondou (SPM), která byla vyvinuta. Jejich nový nástroj byl schopen rozpoznat atomární struktury rastrovým snímáním pomocí vodivého hrotu, který byl připevněný na keramickém piezoelektrickém elementu a pohyboval se přes vodivý vzorek. Díky neuvěřitelnému rozlišení tohoto nového mikroskopu, se setkali s velkým nadšením mezinárodní vědecké komunity a laboratoře po celém světě začaly stavět podobné přístroje.

[2, s. 1]



Obr. č. 1 – G. Binning



Obr. č. 2 - H. Rohrer

Důsledkem vysokého zobrazování vysokého rozlišení, které fungovalo za okolních podmínek, bylo přilákání pozornosti biologů, kteří se rychle spojili s fyziky pro vývoj nových technik STM na zkoumání biologických vzorků. Přestože se STM zobrazování biologických molekul objevovalo v literatuře, bylo obtížné to napodobit. Počáteční pokusy zobrazování biologických vzorků, byly velmi frustrující. Avšak díky metodě STM, vznikl nový podmět pro výzkumné skupiny po celém světě pro vytvoření nové generace SPM nástroje, který by měl větší dopad na zkoumání biologických materiálů. V roce 1986 byla vynalezena nová generace SPM, která se nazývá mikroskopie atomárních sil (AFM) a první AFM se stal komerčně dostupným v roce 1989. Vznikla celé řada přehledných článků a knih o AFM a aplikaci při zkoumání biologických vzorků. Tyto články poskytují cenné informace o AFM technologii a aplikaci v biologii, zatím co následující informace se týkají

vývoje AFM pro biologický výzkum ve 21. století. Dalo by se říct, že AFM je jen jako menší rozšíření STM, ale je zde několik důležitých rozdílů. Například, namísto spoléhání se na elektronickou sondu na konci keramického piezoelektrického elementu pro skenování elektrického potencionálu, AFM využívá flexibilního ocelového nosníku, které má velmi ostrý hrot k mapování fyzických obrysů vzorku. Flexibilní nosník přejíždí po povrchu vzorku a získané datové body jsou souřadnice X, Y a Z. Malý laser, který je zaměřen na zadní část nosníku a dále se odráží na citlivou diodu, která detekuje změny výšky vzorku. Zpětná vazba slouží k regulaci napětí na piezoelektrickém elementu, který pohybuje AFM nosníkem nahoru a dolů, aby se přesně zachovala pozice laseru v ose Z. Kompenzační napětí ze zpětné vazby osy Z se využívá u AFM spolu s datovými body X a Y při vykreslování topografického obrazu vzorku. Výsledky získané pomocí mikroskopie atomární sil se snadněji získávají z STM, ale na rozdíl od STM je AFM schopno zobrazit i nevodivé a izolační materiály. Díky tomu, tuhle novou technologii vědci přijali a využívají ji při zkoumání bílkovin DNA a živých buněk. [2, s. 1]

1.1 Biologický výzkum budoucnosti

Pozoruhodnou charakteristikou biologických procesů je jejich rozměr. Všechny živé organismy, bez ohledu na velikost, jsou organizovány až na molekulární úrovni. Geneticky zakódované instrukce, tisíce různých genů, různé malé molekuly a metabolické reaktanty, meziprodukty a produkty jsou uspořádány a manipulovány pomocí živých systémů o velmi malých objemech. Díky velkému množství genových sekvencí, se zájem vědců zaměřuje na pochopení rolí genů a kódování proteinů, které hrají strukturální a funkční roli buněk. Rozložení těchto složitých systémů bude vyžadovat citlivé experimentální techniky, které mohou identifikovat, lokalizovat a kvantifikovat molekulární interakce, které se vyskytují mezi tisíci molekulami a molekulárními systémy. Bude zapotřebí nových a vylepšených výzkumných zařízení pro splnění těchto nových výzkumných výzev. Mikroskopie skenující sondou, konkrétně AFM, bude hrát významnou roli v post-genomické éře hlavně tím, že zavádí nový přístup k zobrazování na molekulární úrovni ve vysokém rozlišení za fyziologických podmínek. Samozřejmě AFM není zaměřeno pouze na biologické aplikace; využívá se ke zkoumání mnoha materiálů a chemických sloučenin. [2, s. 2]

1.2 Vývoj AFM

1.2.1 Zobrazování pomocí AFM: Kontaktní režim

Jak již bylo uvedeno výše, AFM funguje na principu sledování polohy velmi ostrého hrotu na konci mikro-nosníku, který skenuje povrch vzorku. Nejdříve AFM pracoval pouze v kontaktním režimu; kde AFM hrot je po celou dobu ve fyzickém kontaktu se vzorkem. V kontaktním režimu je interakce hrot-vzorek udržována konstantní silou pomocí keramických piezoelektrických elementů uvnitř AFM skeneru. Piezoelektrický element pohybuje nosníkem nahoru a dolů v průběhu skenování vzorku. Pohyb skeneru pak generuje body, které tvoří topografii vzorku. Fyzikální interakce mezi hrotem AFM nosníku a vzorkem vytváří značné množství bočních sil, takže při zobrazování biologického vzorku vyžaduje, aby vzorek byl pevně umístěn na atomárně rovném substrátu. DNA molekuly mohou být znehybněny na atomárně rovném slídovém povrchu tak, že přidají dvojmocné kationty, například hořčík, kobalt nebo nikl, k uchycení média. Molekula DNA může být znehybněna i reakcí aminosilane činidla, jako je aminopropyltriethoxysilane (APTES), na slídovém povrchu a to umožní AFM zobrazování. Znehybnění biomolekul na povrchu je stále velkou výzvou pro vědce. Pro podrobnější zkoumání této tematiky existuje mnoho článků a knih. Mnoho velmi měkkých biologických vzorků nejsou kompatibilní s kontaktním režimem, protože kontakt s AFM hrotem a veliké boční síly, mohou deformovat nebo dokonce i poškodit povrch vzorku. Proto ani následné zobrazení měkkých vzorků není ve vysokém rozlišení. To dalo podnět ke vzniku AC AFM módu, který může pracovat buď v bezkontaktním režimu, nebo v přerušovaném režimu a nabízí tak řešení při zkoumání měkkých biologických vzorků. [2, s. 2]

1.2.2 Zobrazování pomocí AFM: Dynamický nebo AC AFM režim

Dynamický nebo AC AFM režim je zvláště užitečný při zobrazování jemných biologických vzorků. V AC AFM, je AFM nosník řízen kmitáním nahoru a dolů rezonanční frekvencí pomocí aplikovaného zdroje a díky tomu AFM hrot a vzorek jsou v interakci převážně ve svislé ose. Změny oscilace nosníku, amplitudy, frekvence a fáze jsou řešeny AFM a získávají se tak informace o přiblížení AFM hrotu k povrchu vzorku a díky tomu se generují další zobrazení vzorku. U AC AFM se objevují jen zanedbatelné

boční síly než je tomu u kontaktního režimu a následné degradace vzorku, které jsou často pozorovány se u AC AFM nevyskytují. [2, s. 3]

U AC AFM vzniká interakce způsobená van der Waalsovými silami a dalšími silami s krátkým dosahem a to způsobí mírný útlum oscilační amplitudy ocelového nosníku. Systém AFM sleduje amplitudu a oscilační frekvenci nosníku a udržuje vzdálenost mezi AFM hrotem a vzorkem; poskytuje zpětnou vazbu, která pohybuje skenerem nahoru a dolů. Pohybem skeneru se získávají data, pomocí nichž se generuje topografie vzorku. Interakce mezi AFM hrotem a vzorkem způsobuje odchylky ve frekvenci oscilace nosníku, které jsou přímo spojené s mechanickými vlastnostmi vzorku. Informace o prostorových rozdílech jsou sbírány v různých bodech současně a pak jsou zpracovány a vyhodnocovány. Změna oscilační amplitudy nosníku v každém datovém bodu se používá pro generování amplitudového zobrazení vzorku. Kontrast zobrazení výsledků z fázového zpoždění nebo rozdílů fáze mezi měřením AC vstupní frekvence a výstupní frekvence, je frekvence oscilace nosníku, když je v interakci se vzorkem. Zobrazení fáze je velmi užitečné, protože je důsledkem změn mechanických vlastností vzorku. Kromě toho mohou být jemné morfologické rysy extrahovány z amplitudy a zobrazení fáze. [2, s. 3]

V závislosti na oscilaci amplitudy a na silách, které jsou výsledkem interakcí hrot-vzorek, AC AFM může pracovat buď v bezkontaktním, nebo přerušovaném režimu. V přerušovaném režimu, AFM nosník osciluje v relativně malé amplitudě nad vzorkem, takže interakce mezi hrotem a vzorkem má tendenci tlumit amplitudu kmitání. Proto každý nejspodnější bod dolního cyklu AFM hrotu, označí interakční síly hrot-vzorek jako odpudivé. V bezkontaktním režimu, AFM nosník osciluje volněji; je méně zatížen interakcí hrot-vzorek s relativně větší amplitudou a každý nejspodnější bod dolního cyklu AFM hrotu, označí interakční síly hrot-vzorek jako přitažlivé. [2, s. 3]

Byly vyvinuty dvě technologie pro dynamické řízení nebo oscilování AFM nosníku pro zobrazování. V roce 1987 byl vyvinut akustický AC mód (AAC), který je v současnosti široce využíván. Poprvé byl uveden do prodeje firmou Digital Instruments a je označován jako „pokleповý režim“. V AAC módu je napětí přivedené do piezoelektrického pohonu (PTZ), který je zakomponován do držáku nosíku. PTZ generuje vysoké zvukové vlny, které způsobují oscilaci nosníku v rezonanční frekvenci. To jak AFM hrot osciluje, je snímáno z povrchu vzorku pomocí skeneru. Povrchové síly, jako je interakce van der Waalsových

sil, způsobí mezi hrotem a vzorkem útlum oscilační amplitudy nosníku. Toto snížení amplitudy se využívá u AFM při zobrazování topografie povrchu vzorku. [2, s. 4]

Jedinou nevýhodou AAC módu je, že akustická vlna způsobuje velké množství mechanických rezonancí. V módu AAC akustická vlna způsobuje nejen kmitání AFM nosníku, ale působí i na držák nosníku a tekutinu obklopující vzorek. Výsledkem je kombinace skutečné rezonance nosíku a vzorku. To má za následek komplikovaný signál a hlučné pozadí, které omezuje nejmenší amplitudu kmitů, které lze použít v AAC módu. Velkou výhodou provozu AFM v kapalině je relativní nedostatek přilnavosti mezi hrotem a vzorkem, ale z důvodu rušivých poruch způsobených akustickými vlnami v AAC módu se v kapalině vyskytují „špičky“. Tohle je často obtížné vhodně označit vrchol, ve kterém nosník osciluje ve „špičce“. [2, s. 4]

Kontakt mezi AFM hrotem a vzorkem v AAC módu je nejčastěji považován za přerušovaný, ale jinak tomu je u jiného typu AC AFM módu, MAC módu (magnetický AC mód). Magnetický AC mód má zjevné výhody oproti AAC nebo pokleповému režimu a to převážně u zobrazování v tekutinách, při nejmenším tím, že postrádá poruchy z akustických vln. To poskytne mnohem čistší AFM signál v kapalině, což má za následek velmi kvalitní AFM zobrazení. To je zvláště důležité při zobrazování biologických materiálů. [2, s. 4]

V MAC módu, je AFM nosník potažen paramagnetickým materiálem pro přesnější rezonanci v externím magnetickém poli. Magnetické pole je generováno pomocí střídavého napětí na malé cívice, která je navinuta na feritovém jádru a je umístěna přímo pod nebo nad nosníkem, buď ve skeneru AFM nebo v desce pro umístění vzorku. Přímá a přesná oscilace AFM nosníku znamená, že v MAC módu jsou tekuté médium, držák nosníku a další komponenty v klidu, když nosník osciluje. Výsledkem je velmi čistý rezonanční signál bez „špiček“, takže je snazší vybrat správnou frekvenci oscilace nosníku. Další výhodou přímého řízení nosíku je, že je možné zobrazovat i s nízkou amplitudou oscilace. Energie převedena do vzorku oscilací AFM nosníku je jen zlomková, takže důsledkem použití menší amplitudy je, že MAC mód je mnohem šetrnější zobrazovací režim než AAC. Ve skutečnosti je MAC mód tisíckrát jemnější než v AAC. Jedná se tedy o extrémně jemný zobrazovací režim, deformace vzorku nejsou problém a kontrast zobrazování je velmi dobrá. To je hlavní výhodou pro zobrazování citlivých vzorků, jako jsou například

biologické materiály. MAC mód je patentovaná zobrazovací metoda, která byla vyvinuta firmou Molecular Imaging. Nyní nabízí pouze společnost Agilent Technologies. [2, s. 4]

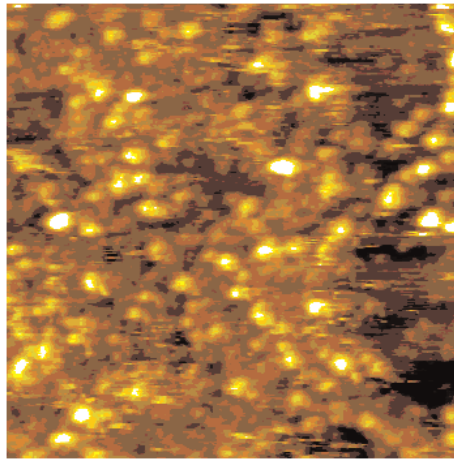
1.2.3 Skenování vzorkem vs Skenování nosníkem

Komerční mikroskopie skenující sondou lze obvykle rozdělit do dvou dalších kategorií, skenování vzorku a skenovací nástroje. Při skenování vzorku je nosník stacionární a pohybuje se vzorek pod nosníkem. V důsledku toho jsou piezoelektrické mechanismy, které řídí pohyb desky se vzorkem. To může vést k problémům, protože místo kolem vzorku je značně omezené a to může způsobit potíže při přidávání dalšího příslušenství. Například umístění topení nebo chlazení přímo na piezoelektrický skenovací mechanismus je velmi často problematické. Další problém může vzniknout při zobrazování v kapalném prostředí, protože případný únik kapaliny ze vzorku představuje významné riziko poškození piezoelektrického snímacího mechanismu. Tohle může být velmi závažné, protože vysoké výkyvy napětí má velký vliv na skenovací mechanismus. [2, s. 4]

Skenování zařízením se obvykle označuje jako skenování z vrchu dolů nebo skenování nosníkem, protože AFM nosník je připevněn přímo na AFM skeneru, který je nad vzorkem pro snímání povrchu. Tím se zabrání mnoha problémům spojených s metodou snímání vzorkem a může přinést další výhody při kombinaci s dalšími AFM nástroji a příslušenství. Například kombinace s optickým mikroskopem. Mezi alternativní příslušenství může patřit například vytápění a chlazení nebo doplňkové rozpoznávací zařízení pro mikročipy. Tyto zařízení jsou pak umístěny do prostoru pod vzorkem při skenování z vrchu dolů. Většina komerčních AFM využívají mechanismus sledování nosníku, který je založen na vychýlení laserového paprsku k udržení pozice nosníku během zobrazování. Laserové sledovací systémy jsou často velmi složité a vyžadují velkou přesnost při montáži. Nedokonalé připevnění sledovacího mechanismu může způsobit problémy s polohováním nosníku a to zapříčiní vady při zobrazování vzorku. Tyto chyby zobrazení zahrnují abnormální výkyvy, které mohou způsobit zobrazení zvlněné plochy místo rovné nebo vlnění v pozadí obrazu. Tyto problémy byly vyřešeny Agilent 5500 s AFM, který využívá patentovaný systém sledování paprsku a ten zaměřuje laser do jednoho bodu na nosník v průběhu skenování. [2, s. 5]

1.2.4 AFM jako výzkumný nástroj

Měření a příprava biologických materiálů, zobrazování různých biologických molekul a dokonce i živých buněk se staly relativně rutinními procedurami. Zobrazování vzorků, jako jsou bakterie S-vrstvých proteinů (viz. **Obr. č. 3**) pomocí MAC módu ve vzduchu i kapalině je již běžným úkazem. Vzhledem k tomu, že přilnavé buňky nevyžadují použití žádných imobilizačních systémů, mohou být buňky umístěny přímo na rovné sklo nebo slídu. Mnoho laboratoří úspěšně zobrazilo přilnavé živé savčí buňky v tekutém prostředí. Rozdílné je pak zobrazení nepřilnavých živých buněk v tekutém prostředí, jako jsou bakterie na **Obr. č. 4**. Ty je třeba nejprve znehybnit pomocí želatiny nebo kolagenu a pak umístit na slídu nebo sklo. [2, s. 5]

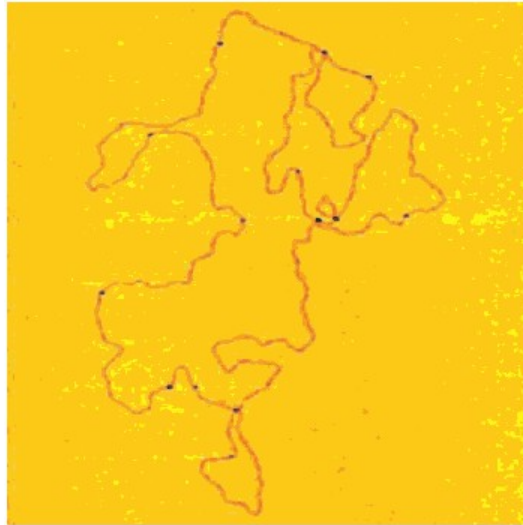


Obr. č. 3 - S-vrstvý protein izolovaný z bakterie zobrazený ve vysokém rozlišení pomocí MAC módu v kapalině.

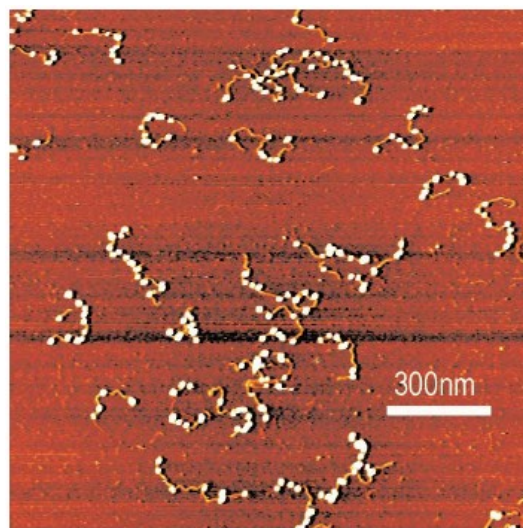


Obr. č. 4 - Zobrazení živé bakterie Rhodospseudomonas palustris, která je znehybněná na želatinou pokryté slídové podložce a uložené v kapalině.

Mnohé vědecké publikace prohlašují, že AFM je schopno zobrazovat vzorky v jakémkoliv prostředí, včetně kapalin. Převážně takhle schopnost zobrazování v molekulárním rozlišení v kapalině činí AFM velmi atraktivním pro zkoumání biologických vzorků. Takže zprvu nenaplněné hlásání, že AFM bude vynikající pro zobrazování v kapalině, je dnes již realitou a má právoplatné místo jako nástroj při řešení biologických problémů, jak ve vzduchu tak zejména v kapalinách. Například omezené mapování DNA molekul pomocí AFM bylo dosažením použitím omezujícího enzymu (EcoRI), který se naváže DNA sekvenci určitým způsobem na hrot AFM nosníku. Omezující enzym byl upraven tak, aby neštěpil DNA. Enzymem upravený hrot je použit k zobrazení a mapování vazeb EcoRI na kosmid DNA vzorku. Zobrazení tohoto experimentu můžete vidět na **Obr. č. 5**. Schopnost zobrazení DNA v kapalném prostředí vedlo k několika dynamickým studiím. Omezením koncentrace nukleoidů trifosfátu (NTP), bylo možné dynamické zobrazení RNA. V tomto pokusu byla slída chemicky upravena ke znehybnění DNA. Byla přidána RNA polymeráza, a tak jak se pohybovala molekule polymerázy podél molekule DNA, AFM zobrazení výsledků RNA překlada se stalo rozpoznatelné. Další dynamické studie provedené v kapalině prokázaly, že změny ve tvaru bílkovin, které se vyskytují u aktivních enzymů lze pozorovat také pomocí AFM. Zejména elegantní je studie z laboratoře Stuart Lindsay dokládá, že je možné monitorovat dynamické změny v proteinu DNA. Chromatin (nukleozom DNA) se podařilo znehybnit. Slída byla ošetřena amino silanem a glutaraldehydem pro uchycení chromatinových nukleozomů, ne k DNA, ale přímo ke slídě. Výsledkem byla nepřímo znehybněná DNA k podkladu, prostřednictvím nekovalentní interakce s nukleozomy. Chromatin byl zobrazen MAC módem (**Obr. č. 6**) a průtok tekutiny byl využit ke změně koncentrace soli při zobrazování. Při nízké koncentraci NaCl byly komplexy nukleozom-DNA pozorovány na AFM snímcích, ale při zvyšování koncentrace soli byly uvolněny interakce nukleozomů s DNA, takže nukleozomy byly jasně viditelné. Dynamické studie, jako je tahle, nejsou omezeny interakcí bílkovina-DNA. Strukturální změny v buňkách savců, jako jsou zničení aktin sítě ve firoblastech cytochalasinem B, byly rovněž zaznamenány pomocí AFM. [2, s. 6]



Obr. č. 5 - AFM zobrazení myšího kosmidu ve vzduchu. Tmavé místa na DNA ukazují individuální EcoRI endonukleozové molekuly, které se vážou na DNA molekuly specifickým způsobem. To dokládá užitečnost AFM ke studiu DNA a mapování DNA sekvencí se specifickými proteiny za běžných podmínek.

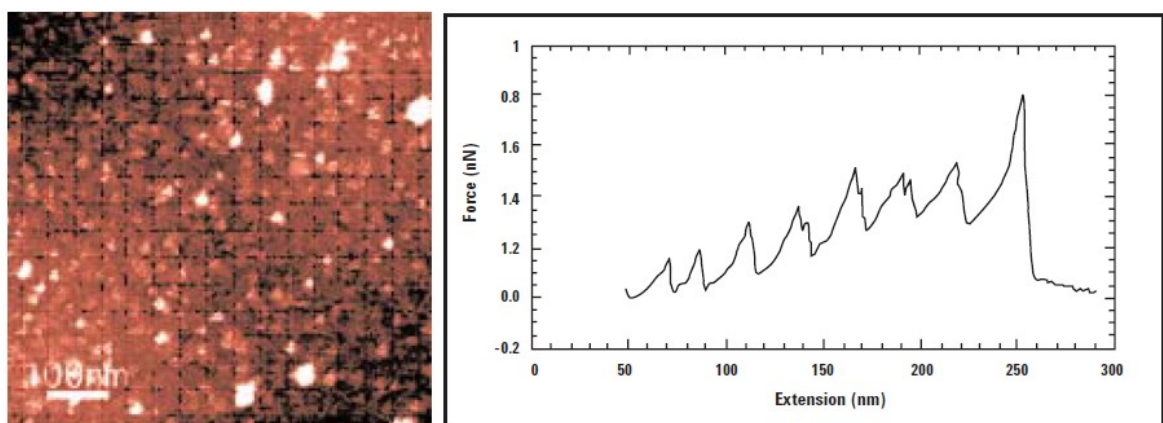


Obr. č. 6 - Zobrazení chromatinu pomocí MAC módu. Tyto proteiny, zvané nukleozomy, jsou součástí DNA.

1.2.5 AFM spektroskopie sil

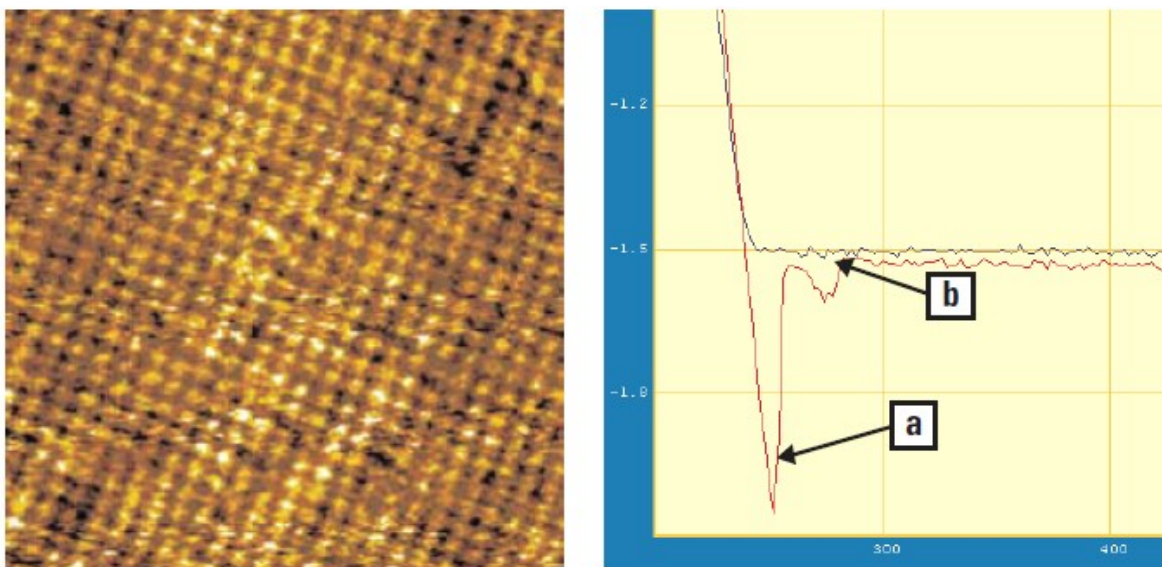
Unikátní vlastností mikroskopie skenující sondou je schopnost měřit nepatrné síly, které jsou zodpovědné za různé molekulární interakce. Pokusy s mikroskopií dynamických sil (DFM) nebo spektroskopií dynamických sil (DFS) mohou být provedeny pomocí AFM připevnění biologického polymeru na jedné straně, jako je DNA nebo protein na hrot AFM nosníku a druhý konec biologického polymeru k pevnému povrchu. Když se AFM hrot vzdálí od povrchu, mohou vzniknout inframolekulární síly, které je třeba překonat pro

prodloužení biologického polymeru. To je měřeno a výsledky slouží k vytvoření křivky síla-vzdálenost (taky označována jako křivka síla-prodloužení). Křivky síla-vzdálenost jsou možné vyjádřit, protože je možné změřit síly podílející se na molekulárních interakcích biologických vzorků, měřením sub-angstrom deflekce, když se nosník odklání od povrchu. Výsledky mohou být použity pro kvantifikaci inframolekulární síly, tak malé jako je velikost několika slabých van der Waals interakcí nebo dokonce nezávazná síla jediné vodíkové vazby. V DFM experimentu prodloužení bílkoviny, molekule proteinu se složitou terciální strukturou byla absorbována zlatou vrstvou, která pokrývá slídu. Hrot AFM nosníku, který byl taky potažen zlatem pro zachycení bílkoviny, byl posunut do kontaktu s imobilizovanou molekulou proteinu a pak byl zase odtažen. Zobrazení, které vznikne prodloužením proteinu je evidentně křivka síla-vzdálenost. Mechanické bílkoviny titin a tenascin byly rozsáhle studovány pomocí jedno-molekulového DFM experimentu. Každé minimum v grafu síla-vzdálenost pro titin na **Obr. č. 7** indikuje maximální sílu; kde jsou individuální titin domény prodlouženy oddálením AFM nosníku. vzdálenost mezi jednotlivými vrcholy minima odpovídají délce strukturální domény. V tomto experimentu byla potřebná síla k prodloužení vypočítána na 150 – 300 pN s periodicitou mezi rozšíření domény 25 – 28 nm. To dobře koreluje s údaji z jiných technologií, ve kterých byla stanovena vzdálenost jedné Ig domény titinu nejméně 31 nm. Další pokusy s rožširováním síla-vzdálenost byly provedeny u polysacharidů, molekul DNA a různých alkoholů. [2, s. 6-7]



Obr. č. 7 - Vlevo: AFM zobrazení titin molekule. Vpravo: Křivka síla-vzdálenost vyplývající z praskání jednotlivých částí jedno-molekulového titinu. Molekula titinu byla upevněna k pevnému povrchu a pak prodlužována pomocí AFM hrotu, který se vzdaloval od povrchu. Každé maximum odpovídá síle potřebné k prasknutí individuální oblasti. Vzdálenost mezi vrcholy křivky odpovídá délce každé oblasti.

Extrémní citlivost AFM může být využita k měření molekulárních sil, které zahrnují doplňkové páry molekul. Například energie potřebná k přetržení vodíkového pouta mezi doplňkovými řetězci DNA byla změřena připojením jednovláknové molekuly DNA na AFM hrot a připevněním doplňkového řetězce DNA k podkladu. Malé interakce molekule-receptor byly rovněž měřeny pomocí AFM. Například interakce biotin-avidin a biotin-streptavidin byly měřeny připojením biotinu ke hrotu na AFM nosníku a upevnění avidinu nebo streptavidinu k podkladu. Po připravení interakce biotin a avidin nebo streptavidin molekul, AFM nosník byl oddálen a síla určená k tahu byla měřena s cílem určit sílu interakce. Další zajímavá zpráva popisuje, jak byly eukaryotické buňky připojeny ke hrotu na AFM nosníku a pak vytvářeli interakce s jinou buňkou, která rostla v Petriho misce. Hrot na AFM nosníku byl odtažen od Petriho misky tak, aby překonal adhezivní interakce mezi dvěma buňkami a síla by mohla být změřena. Adhezivní interakce mezi párem molekul může být měřena a porovnávána různými AFM. Výsledky byly shledány dostatečně konzistentní. Například pozlacený AFM hrot a podklad, oba upravené 11-mercaptoundecanoic kyselinou. Šířičité skupiny každé mercaptoundecanoic kyseliny molekuly se vážou na zlatem potažený hrot a podklad. AFM hrot byl odtažen od podkladu, potřebná síla přerušení jedné vodíkové vazby byla měřena pomocí AFM a vypočtená hodnota byla 16,6 pN. V podobném experimentu byla změřena potřebná síla přerušení jedné vodíkové vazby vypočtena na 12 pN. [2, s. 7]

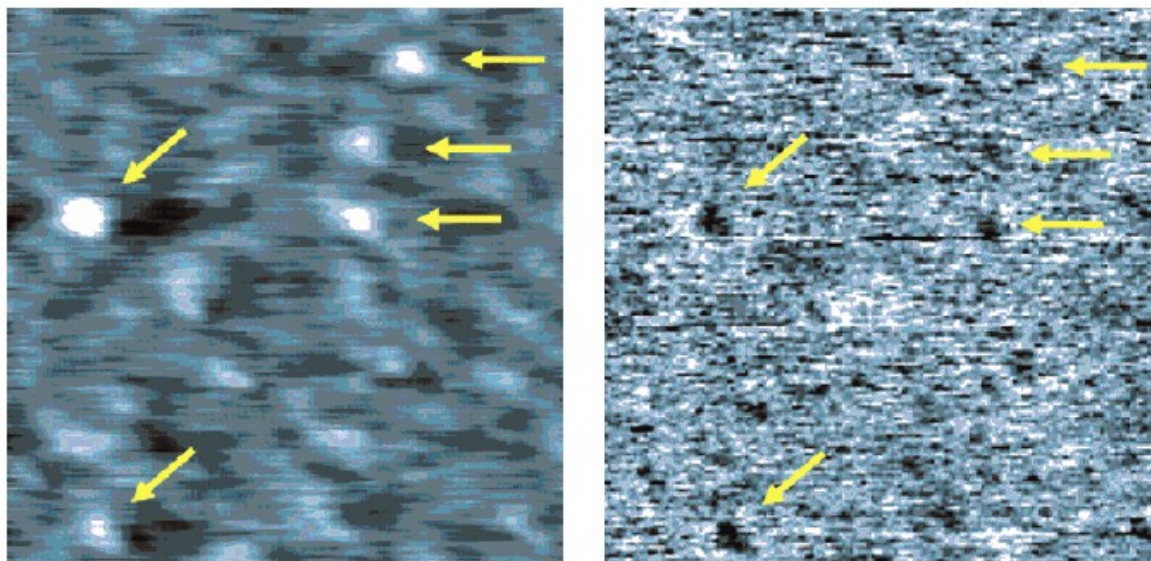


Obr. č. 8 - Vlevo: Zobrazení avidinu na slídivém povrchu pomocí MAC módu. Vpravo: Zkoumáním povrchu, pokrytém avidinem pomocí AFM hrotu na kterém je molekula biotinu, vznikla křivka síla-vzdálenost pro interakci biotin-avidin. Modrá čára zobrazuje chování AFM hrotu vůči povrchu s avidinem. Červená čára představuje oddalování biotinylovaného hrotu od povrchu. Na křivce je

vrchol, který představuje nespecifikovatelnou adhezi mezi AFM hrotem a avidinem pokrytým povrchem (a). Navíc je zde zobrazen vrchol, který odpovídá síle potřebné k uvolňující události mezi biotinem a avidinem (b).

Na **Obr. č. 8** je zobrazena avidin molekule a je připevněna k povrchu. V jednom experimentu byl biotin připojen ke hrotu na AFM nosníku pomocí 30 nm PEG linkeru a tím vznikla křivka síla-vzdálenost. Oddálením AFM nosníku od povrchu byla viditelná adheze mezi AFM hrotem a avidinem na křivce síla-vzdálenost. Při oddálení biotinylového AFM nosníku od povrchu je možné vidět druhý vrchol. Druhý vrchol se nachází přibližně 30 nm od prvního adhezního vrcholu a je výsledkem nevázané události mezi molekulou biotinu, připevněné 30 nm PEG linkerem a z druhé strany připevněné k povrchu. Intramolekulární a mezimolekulární vazebné síly prodloužení a přetržení se mohou měřit nejmodernějšími metodami AFM, ale taky použití laseru může výrazně snížit šum v pozadí křivky síla-vzdálenost s uzavřenou smyčkou Z piezoelektrického elementu. Možnost naprogramování pohybů AFM nosníku pro provozovatele AFM je taky velmi důležitá. Navíc přístup k programovatelným aplikacím, které umožňují nastavení předem definované síly a úroveň síly, je velmi užitečný pro experimenty. [2, s. 7-8]

Mikroskopie rozpoznávání molekulárních sil (MRFM) je další oblastí, kde AFM hraje významnou roli v současném výzkumu biomolekul a měl by tuhle roli zastávat i v budoucnu. MRFM kombinuje snímání topografie se simultánním molekulárním rozpoznáváním mezi hostitelem a hostem nebo ligandreceptorovými páry. V MRFM je molekulární sonda připevněna na hrot AFM nosníku pomocí kártého (6-8 nm) polyethylenglykol (PEG) úvazu. Jak AFM nosník skenuje povrch vzorku, je získávána topografie vzorku spolu se zobrazením molekulárních interakcí mezi sondou na AFM hrotu a doplňující oblastí na vzorku. MRFM byla poprvé předvedena při zobrazování lysozymu v MAC módu, když na AFM hrotu byl připevněný PEG linker a protilátka byla připojena k lysozymu. Při skenování hrotem s protilátkou a linkerem přes znehybněné molekuly lysozymu, byla získána zobrazením topografie informace ohledně interakce mezi protilátkou a antigenem. Nicméně zobrazení topografie je zkreslené kvůli molekulární interakci mezi molekulami lysozymu a protilátkou. [2, s. 8]



Obr. č. 9 - MAC mód topografie (vlevo) a simultánní zobrazení molekulárního rozpoznávání (vpravo) avidinu a interakce biotin-avidin pomocí PicoTREC a Agilent 5500 AFM/SPM. Na slídový povrch byly upevněny molekuly avidinu a pak byly skenovány AFM hrotem modifikovaným biotinem. Na výsledném zobrazení topografie jsou vidět bílé oblasti, které představují molekuly avidinu. Tmavé oblasti odpovídají molekulárním interakcím mezi biotinem a avidinem. Tyto interakce jsou ve stejných místech, jako jsou viděny u topografie.

Pomocí speciálně navrženého hardware a MAC módu, mohou být odděleny informace o interakci mezi ligandy a receptory z topografie získané z mapování interakcí ligand-receptor a protilátka-antigen. Skupina Hinterdorfer připevnila biotin na hrot AFM nosníku a znehybnila avidin na slídové podložce. Když AFM hrot s biotinem skenoval podložku pokrytou avidinem, byly současně vyřešeny a zobrazeny snímky MAC topografie avidinu a interakce avidin-biotin (**Obr. č. 9**). Hardware, který byl zapotřebí k rozpoznávání z MAC topografie, se nazývá PicoTREC a je k dispozici jako volitelný doplněk k Agilent 5500 série AFM/SPM. [2, s. 8]

1.2.6 Microarray analýza pomocí AFM

Microarray technologie má největší dopad na oblast genového profilování a DNA sekvence nebo SNP identifikace. Ale lze využít i při zkoumání proteinů, membrán, buněk či malých molekul. Bohužel, pohodlné označování a detekční metody pro materiály jiné než jsou nukleoidové kyseliny a proteiny nejsou k dispozici, tzv. „bez-štítkové“ detekční systémy by byly přínosem pro technologii microarray. Různé biologické molekuly mohou být připevněny na AFM nosník, ale pro mikroskopii dynamických sil (DFM) na velkých polích biologických molekul bude potřeba vylepšení hardware a software. Konvenční

microarray jsou tvořeny různými prostředky, včetně číidla vstřikováním, pin vyhledávání nebo litografické techniky. Microarray jsou obvykle složeny z jednotlivých mikroskopických míst se samostatnou chemickou identifikací, uspořádané na skleněném sklíčku mikroskopu. Stovky nebo i tisíce těchto míst lze uspořádat do jednoho typického microarray. Tyto pole mohou reagovat s různými testovacími činidly a s pomocí specializovaných přístrojů a software mohou být vyhodnoceny tisíce konkrétních interakcí. Aktuální microarray technologie se soustřeďuje na tisíce molekulárních interakcí na poli; obvykle se ale nejedná o vyjádření velikosti interakční síly mezi integrovanými vzorky, ani hodnocení molekul na jedno-molekulární úrovni. Kombinací AFM s microarray technologií, by mohli být stanoveny síly molekulárních interakcí mezi prvky pole a stanovenými činidly. To vyžaduje, aby byl umístěn AFM skenovací mechanismus nad vzorkem a AFM nosník byl pevně připevněn ke skenovacímu mechanismu, aby vznikl dostatečný prostor pod vzorkem pro umístění jednotlivých microarray prvků a jejich sladění s AFM nosníkem. [2, s. 9]

1.3 Shrnutí

Mikroskopie skenující sondou došla do stádia, kdy lze předpokládat, že bude hrát významnou roli ve vědeckém výzkumu 21. století. Tento obor se stále rozvíjí. Výrobci komerčních nástrojů touží začlenit nové poznatky od výzkumných pracovníků do nových komerčních produktů. Spekulovat o dalším vývoji měřících nástrojů je riskantní, ale lze zaznamenat velký pokrok v pohledu na zkoumání biologických materiálů a to by mohlo pomoci k vývoji dokonalejších měřících technik. Konec 20. Století se proslavil rozluštěním lidského genomu. Na počátku tohoto století se vědci snaží o pochopení, jak se geny ovlivňují pro zachování fyziologických procesů, buněk a živých organismů. Jak už bylo uvedeno, bude to vyžadovat metody pro identifikaci, mapování a měření mnoha různých slabých molekulárních interakcí, které se vyskytují u živých buněk. Jak bude vývoj AFM využit při řešení těchto nových výzev záleží jen na nás. [2, s. 10]

2 AFM

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je mikroskopická technika, která se používá k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Obraz povrchu se zde sestavuje postupně, bod po bodu. Metoda dosahuje velmi vysokého rozlišení – může zobrazovat i atomy. Techniku AFM lze použít nejen k zobrazování, ale také k tvorbě struktur či zpracování povrchů v nanometrové oblasti.

V principu je AFM podobná metoda jako tunelová mikroskopie. K detekci však neslouží elektrický proud, ale vzájemná meziatomová přitažlivost. Detekuje se pohyb zkoumacího hrotu při průchodu nad vzorkem. Umí zobrazovat i nevodivé vzorky. [5, s. 1]

2.1 Výhody a nevýhody použití AFM

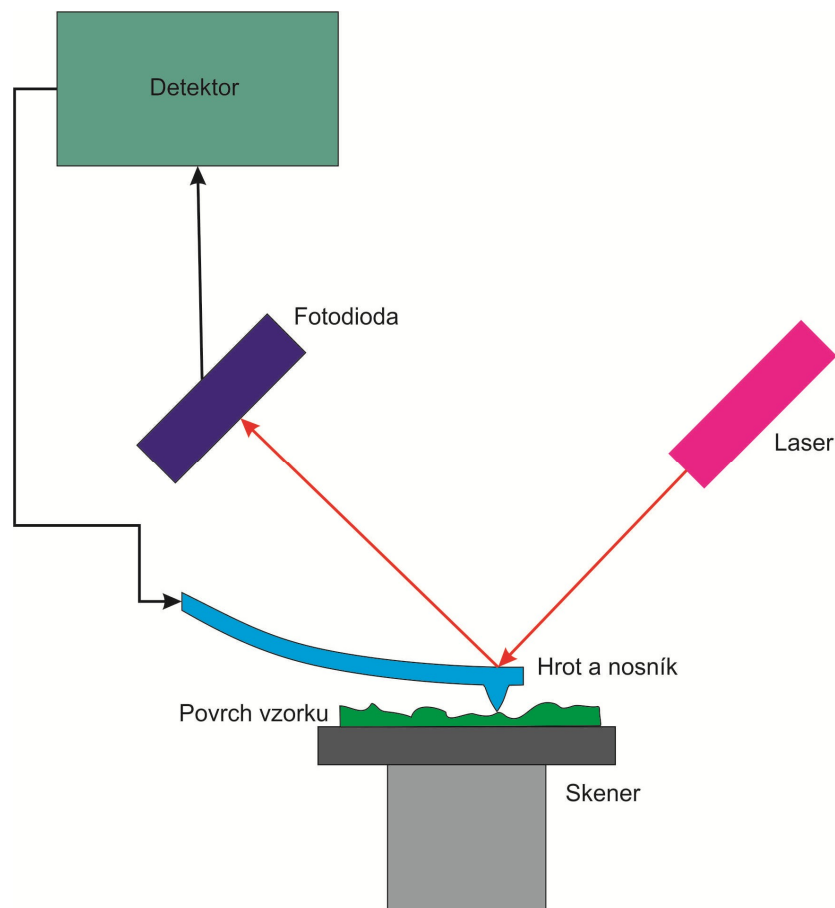
Výhody AFM:

- Umožňuje kvantitativní měření povrchu.
- Může zobrazit jakýkoliv pevný povrch bez zvláštní přípravy vzorku.
- Může měřit fyzikální síly.
- Ve srovnání s elektronovou mikroskopií (SEM), může poskytnout přesnější topografický kontrast, přímé měření výšek a nezastíněný výhled na povrchové rysy.
- Ve srovnání s transmisní elektronovou mikroskopií (TEM), může poskytnout trojrozměrné snímky bez drahé přípravy vzorku a poskytuje mnohem více informací, než TEM s dostupným módem křížové členění vzorku.
- Ve srovnání s optickými interferometrickými mikroskopy, může jednoznačně stanovit měření výšky kroku, nezávisle na rozdílné odrazivosti různých materiálů.
- Kvalitativní topografie a určování povrchu pomocí AFM může být korelováno (pomocí multivariačních statistických postupů nebo neuronových síťových analýz) s dalšími nezávislými měřeními vlastností povrchů, jako jsou chemické nebo mikrobiologické adsorbční data, vodní tok, přeprava rozpustných látek, povrchová energie atd.

Nevýhodou AFM v porovnání s elektronovým mikroskopem, je velikost obrazu. Elektronový mikroskop je schopen zobrazit plochu v řádech mm^2 a hloubku v milimetrech. AFM může zobrazit maximální výšku v mikrometrech a maximální plochu $125 \times 125 \mu\text{m}$. Další nevýhodou je pomalé skenování, které má odstranit artefakty (o tomto pojmu si řekneme více v kapitole zvané Artefakty). [6, s. 22-23]

2.2 Složení AFM mikroskopu

Součástí AFM mikroskopu je nosník s hrotem a plní funkci sondy. Laser směřuje svůj paprsek do jednoho místa na nosníku, od něj se odráží do fotodiody, která detekuje pohyby nosníku a tím vytváří zobrazení vzorku. Skener slouží k rastrování vzorku.



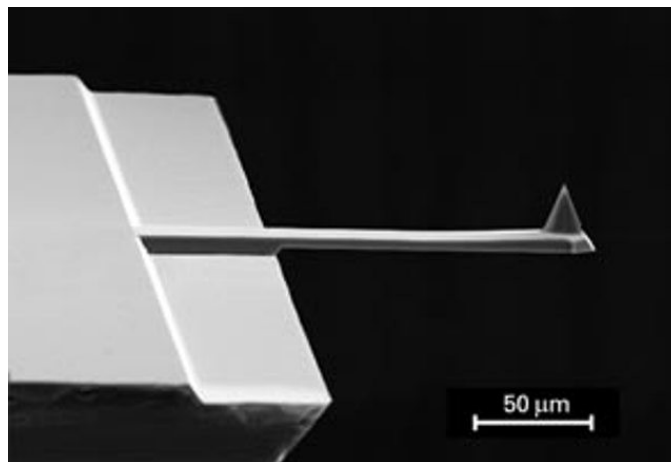
Obr. č. 10 - Schéma AFM mikroskopu

2.2.1 Hrot a nosník

Pro zkoumání mikroskopie atomárních sil nestačí zhotovit pouze ostrý hrot, ale je důležité vyrobit také nosník, který svým ohybem identifikuje velikost interakční síly. U STM se měřil pouze proud procházející vzorkem, tudíž stačil pouze ostrý drát nasměrovaný kolmo ke vzorku. Po pokusech se zahnutými hroty se začali používat nosníky upravené litografickými technologiemi (**Obr. č. 11**). [1]

Na AFM nosníky jsou kladeny požadavky na vysoké rezonanční frekvence (10–500 kHz) a malé setrvačnosti. Kvalita odezvy na náhlé změny je určována hmotností a tuhostí.

Závisí tedy na původní rezonanční frekvenci. Minimální hodnota tuhosti je limitována stabilitou měření. Nesmí dojít k přilnutí nosníku ke vzorku. [1]



Obr. č. 11 - Hrot a nosník

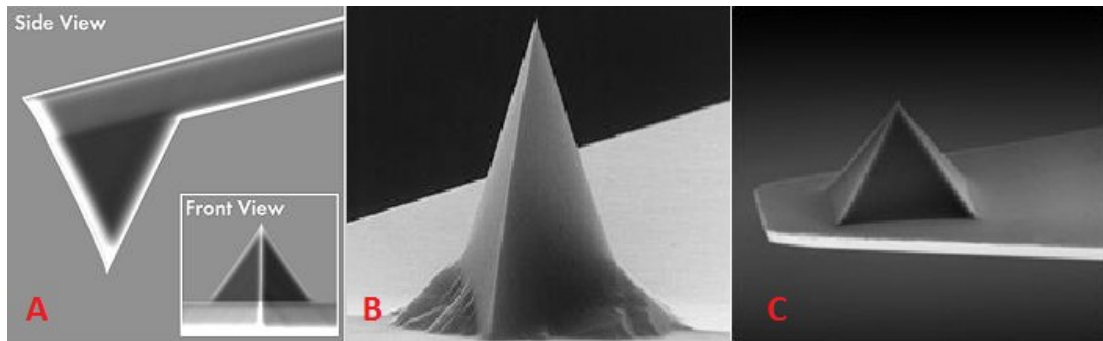
[7]

V současné době jsou nejpoužívanější dva základní tvary nosníku:

- plochý tenký kvádr
- trojúhelníkové spojení dvou plochých kvádrů vytvářejících písmenko V

Uvedené vlastnosti nosníku závisí na jeho použití. Pro dotkový režim se používá pružný nosník ve tvaru V, pro bezkontaktní režim, pevné ploché kvádry, které jsou velmi křehké. Jelikož v dotkovém režimu působí velké boční síly, musí být nosník odolný vůči zkroucení. Nosníky se vyrábějí nejčastěji z křemíku s příměsemi Si_3N_4 nebo SiO_2 . Množství příměsí výrazně ovlivňuje výšku nosníku. [1]

Ostrost hrotu udává rozlišení zobrazení. Hrot je umístěn na konci nosníku a může mít různé tvary, dle použití (viz. **Obr. č. 12**). Mezi další charakteristické vlastnosti patří jeho délka (cca 10nm), zeštíhlení (1:3, speciální hroty 1:10), které ovlivňuje schopnost zobrazovat ostré hrany a hluboké zářezy, dále boční tuhost, mechanická a chemická odolnost a v neposlední řadě poloměr křivosti hrotu, který ovlivňuje maximální rozlišení a pohybuje se v rozmezí 1-50nm. [1]



Obr. č. 12 - AFM hroty (A – šípový hrot pro pokleповý režim, B – hrot pro kontaktní režim, C – pyramidový hrot)

[8]

Hroty je možné libovolně upravovat a tím tak zlepšit některé jejich vlastnosti. Na hrot je možné nanést vrstvu organické sloučeniny a tím snížit vliv kapilárních sil. Dále je možné špičku hrotu pokrýt vodivou či magnetickou vrstvou. Nově objevená metoda spočívá v použití nanotrubiček, což jsou duté válcové útvary malého poloměru a relativně velké délky. Štíhlost zaručuje zmenšení poloměru křivosti hrotu, což uděluje hrotu lepší zobrazovací vlastnosti. Nanotrubičky vynikají také malou adhezí ke vzorku (hladší obraz), ohebností (zmenšení frekvence lámání hrotu), přesnou stavbou a možností naplnit trubičku chemicky či biologicky aktivní látkou. [1]

Vyrobený nosník většinou zůstává připevněný na bázi, která se umísťuje do mikroskopu. Báze se přilepuje na další podložku, která umožní snazší manipulaci.

Síly, které působí mezi hrotem a vzorkem mohou být definovány pomocí Hookova zákona:

$$F = k \cdot \Delta Z,$$

k je konstanta tuhosti nosníku

ΔZ je výchylka nosníku v ose Z

2.2.2 Skener

Skener slouží ke kontrole vzdálenosti mezi hrotem a vzorkem a dodává hrotu prostorovou orientaci vzhledem ke vzorku. Vyrábí se většinou z piezoelektrických

materiálů, které mají požadované piezoelektrické vlastnosti: mění svoji velikost v závislosti na vnějším elektrickém poli. Skener se skládá z piezokeramických válečků, uspořádaných ve dvou možných variantách:

- **Trojnožka** - tvořená třemi válečky položenými ve vzájemně kolmých směrech
- **Trubička** - je dutá a obstarává pohyby ve všech třech směrech

Piezokeramika jako taková je zastoupena polarizovaným polykrystalickým materiálem, který se získává spečením krystalů. Polarizace keramiky je umožněna jejím zahřátím na Curieho teplotu (většinou méně než 300°C) a následným velmi pomalým ochlazováním v silném elektrickém poli. Tato úprava má za následek trvalou polarizaci materiálu a také schopnost měnit svoji velikost na základě přiloženého vnějšího elektrického pole. [1]

Jsou dvě možnosti umístění skeneru:

- Pod vzorkem – pevné uchycení hrotu
- Spojený s hrotem a nosníkem – pevné uchycení vzorku

2.2.3 Fotodioda

K detekci ohybu nosníku používaly první AFM přístroje další mikroskop, dále pak kapacitní detekci. V současné době je nejpoužívanější metodou optická detekce.

U **optické metody** se snímá laserový paprsek, který dopadá na nosník, odráží se a pomocí zrcátka je nasměrován k detektoru – fotodiodě (**Obr. č. 10**). Fotodioda je rozdělena na dvě, nebo čtyři části a před měřením je nutné ji nastavit tak, aby do všech částí dopadla stejně velká energie odraženého paprsku. Pohyb nosníku změní úhel dopadu paprsku, který se tedy odchýlí a z rozdílového signálu se určuje úhlová velikost ohybu a z ní případný výškový rozdíl. [1]

Existují dva typy detektorů:

- dvou-segmentové
- čtyř-segmentové

V současnosti se nejvíce používá čtyř-segmentový detektor, protože umožňuje měřit i zkrut nosníku, který může být způsoben například třecími silami při kontaktním měření.

U **detekce diferenciálním interferometrem** dopadají dva vzájemně kolmé svazky na nosník ve dvou různých místech.

V ojedinělých případech se používá **piezorezistivní detekce**, kdy je nosník vyroben z piezoelektrického materiálu a s jeho ohybem se zároveň mění i jeho odpor, který se posléze měří a slouží k sestavení obrazu. [1]

2.3 Síly uplatňující v AFM

AFM je metoda založena na snímání sil mezi hrotem a povrchem zkoumaného vzorku. Podstatná většina sil má původ v atomárních interakcích, také je důležité přičíst tvar hrotu a vzorku, abychom mohli určit skutečný obraz. Mezi charakteristické síly patří van der Waalovy síly (působí ve vzdálenostech 0,1 až 100 nm, jsou neaditivní, maximální rozlišení je v řádu nm). Dále jsou pak síly krátkého dosahu – odpudivé síly, které vznikají v důsledku kombinace Pauliho principu a Coulombovského odpuzování jader atomů (uvedené síly lze modelovat mocninným zákonem r^{-n} , $n > 8$, kde r je vzdálenost jader atomů a n je jejich počet, nebo exponenciálním). Další síly krátkého dosahu mohou být: fyzioreorpce a chemoreorpce (vazby mezi hrotem a vzorkem), kovová adheze (přitažlivé síly mezi dvěma kovy), plastická a elastická deformace, tření. Velký vliv na nosník a hrot mají kapilární síly, tyto síly mají původ v tenkém menisku vody, který se vytvoří z vody adsorbované na povrchu preparátu v místě kontaktu hrotu se vzorkem. [3, s. 13]

Křivka na **Obr. č. 13** znázorňuje závislost zúčastněných sil na vzdálenosti. V grafu jsou zobrazeny jak odpudivé síly, tak přitažlivé. Tato závislost vychází odvozením z Lennard-Jonesova potenciálu.

$$U(f) = \varepsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right]$$

kde ε je konstanta,

r je vzdálenost mezi dvěma na sebe působícími částicemi,

r_0 konečná poloha, v níž je nulový potenciál.



Obr. č. 13 - Síly působící mezi hrotem a vzorkem

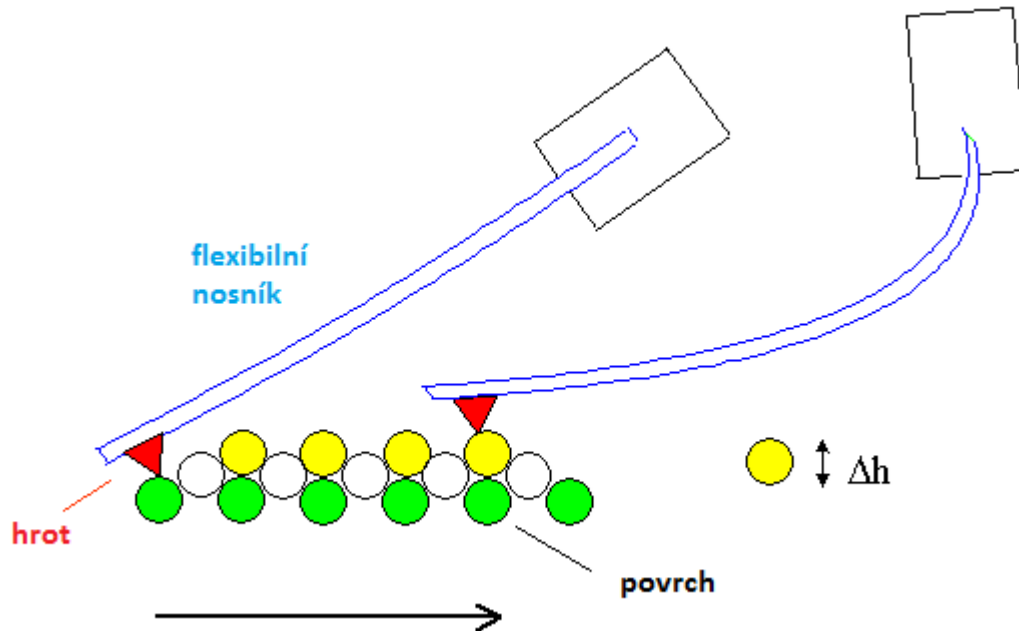
2.3.1 Měření a používané režimy v AFM

Měření vzorků pomocí AFM lze provádět v různých režimech (módech). Jednotlivé módy se liší vzdáleností hrotu od vzorku a také silami mezi nimi působícími. Nejčastěji se využívá kontaktní, bezkontaktní a pokleповý režim (jedná se o mezistupeň mezi dvěma dříve jmenovanými režimy, viz **Obr. č. 13**). S rozvojem AFM přibyl velký počet měřicích režimů. Pro základní pochopení principů AFM bude stačit znát zmíněné tři základní principy.

2.3.1.1 Kontaktní režim

Tento režim měří v těsné blízkosti hrotu od vzorku, kde působí odpudivé síly (řádově 7-10 N) a ty ohýbají nosník směrem od povrchu vzorku. Ohnutí nosníku je úměrné síle, kterou drží atomy vzorku pohromadě. Pokud je tuhost nosníku větší než soudržnost měřeného materiálu, dojde k poškození vzorku. To se často stává při zkoumání měkkých

biologických materiálů. Při měření v tomto režimu se uplatňují kapilární a adhezní síly. Kontaktním režimem lze dosáhnout jen rozlišení periodicity mřížky v důsledku rychlého skenování a také díky mírnému poklesu interakce se vzdáleností. [12, s. 27-29]



Obr. č. 14 - Kontaktní režim ($D \sim F \sim \Delta h$, kde Δh = vertikální pohyb hrotu, F = interakční síla, D = deflece nosníku)

[10]

Snímání povrchu kontaktním režimem lze provést několika metodami:

- **s konstantní výškou** – udržuje se konstantní výška nad povrchem vzorku (osa z). Při snímání topografie vzorku se nosník ohýbá (osa z) a tento průhyb nosníku se měří. Přesnost měření závisí na frekvenci, na stabilitě polohy a na kalibraci nosníku.
- **s konstantní silou** – u této metody se udržuje konstantní průhyb nosníku s využitím zpětné vazby. Při pohybu vzorku nebo hrotu ve směru osy z , se provádí zkoumání povrchu. Nevýhodou je delší doba měření (určuje rychlost zpětné vazby). I přes delší dobu měření se používá častěji, z důvodů větší přesnosti (prohnutí nosníku není ovlivněno kapilárními silami a jeho vlastní pružností).
- **kombinovaný režim** – tento mód je nejméně využíván. Principem je kombinace zpětné vazby k dorovnání výšek s nízkou frekvencí a měření ohybu nosníku.

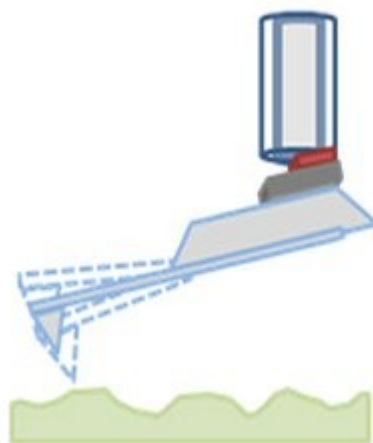
2.3.1.2 *Bezkontaktní režim*

Kvůli velké pravděpodobnosti poškození povrchu měkkých vzorků kontaktním režimem, především biologických materiálů, vedlo k zavedení bezkontaktního režimu. Pro tento režim se využívají hlavně síly delšího dosahu, především van der Waalsovy síly. U tohoto režimu je nutné zvolit vhodný nosník s větší tuhostí (při malé tuhosti by mohlo dojít k zachycení na povrchu vzorku). Hrot kopíruje vzorek ve vzdálenosti 1–10 nm. Celková síla se pohybuje okolo 10-12 N.

Nosník je rozkmitán na rezonanční frekvenci (většinou 50–500 kHz). Amplituda nesmí být moc velká, aby nedocházelo ke kontaktu se vzorkem. Detekují se změny v rezonanční frekvenci či amplitudě kmitů nosníku při přibližování nebo oddalování hrotu od povrchu vzorku. Nevýhodou může být možnost, že hrot bude vtažen do vrstvy kapaliny a nebude mít energii na uvolnění. [12, s. 30-31]

2.3.1.3 *Pokleповý režim*

Kombinace uvedených dvou režimů je pokleповý režim (tapping nebo semi-kontaktní režim). Nosník se rozkmitá na velkou frekvenci tak, že se hrot, který je umístěn v těsné blízkosti vzorku, dotýká (klepe) povrchu studovaného předmětu (viz. **Obr. č. 15**). Změny rezonanční frekvence slouží k zobrazení povrchu. Snímací frekvence u pokleповého režimu je o něco málo menší než frekvence ve volném prostoru, tudíž s přibližováním se ke vzorku roste amplituda vibrací. Tento režim umožňuje snímat plochu s větším rozpětím v ose z . Díky nižším silám, které působí při měření na preparát, se tento režim používá při zkoumání citlivějších vzorku, převážně biologických, protože nedochází k poškození nebo poškrábaní povrchu. Ovšem na rozdíl od kontaktního režimu, je tahle metoda pomalejší. [12, s. 32]



Obr. č. 15 - Poklepový režim

[11]

2.3.2 Spektroskopie sil

Spektroskopií v AFM se rozumí měření závislosti síly a na vzdálenosti od povrchu, respektive vzdálenosti z_t (z_s), kde z_t je poloha hrotu a z_s je poloha vzorku. Pro sílu platí Hookův zákon:

$$\mathbf{F} = -\mathbf{k} \times \mathbf{d}$$

\mathbf{F} je síla působící na nosník

\mathbf{k} je silová konstanta nosníku

\mathbf{d} je výchylka

Zanedbáme-li elastické deformace, je vzdálenost hrot – vzorek rovna $\mathbf{d} = \mathbf{z}_t - \mathbf{z}_s$. Studium závislosti síly působící mezi hrotem a povrchem vzorku na vzdálenosti hrotu od povrchu vzorku je užitečné pro monitorování vertikální síly, kterou hrot působí na povrch v kontaktním AFM režimu. Tato technika může být použita k analýze kontaminovaných povrchů (viskózní látky, lubrikanty, lokální změny v elastických vlastnostech povrchu apod.). Spektroskopie umožňuje např. měření síly jednotlivých vazeb, protože při oddalování je možno pozorovat skoky odpovídající jednotlivým odtržením.

Ke spektroskopickému měření se používá pozičně-citlivého fotodetektoru. Je to vlastně graf závislosti výchylky nosníku na napětí piezoelektrického skeneru. Jednou ze sil, která ovlivňuje ohyb nosníku je Van der Waalsova silová interakce. Další jsou lokální změny elastických vlastností, které se projeví změnou tvaru F-d křivky. Měření mohou ovlivnit nečistoty a lubrikanty na povrchu, podobně jako ho ovlivní tenká vrstva vody na povrchu vzorku analyzovaného ve vzduchu. [3, s. 15]

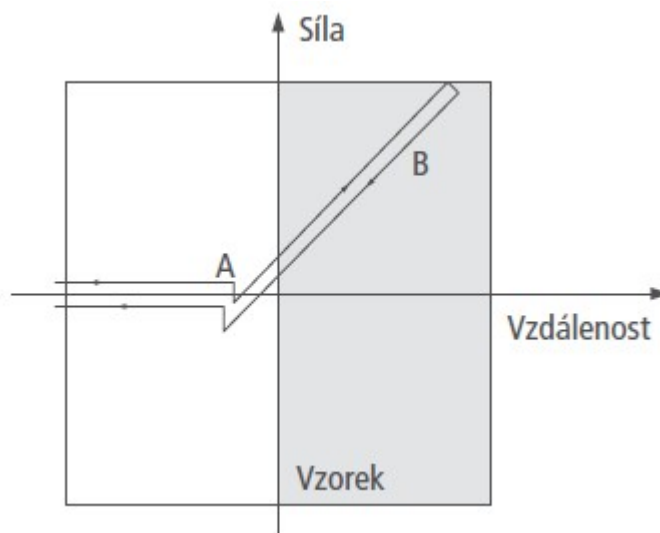
2.3.3 F-d křivka

Průběh křivky znázorňuje působící síly mezi hrotem a vzorkem. Přibližováním se ke vzorku se projeví zejména daleko-dosahové síly, to jsou především síly s elektrostatickým charakterem, které se projeví přitahováním hrotu ke vzorku. Dochází zejména k zápornému průhybu a to se projeví tím, že se přímka zaoblí směrem dolů (naznačuje směr přitahování k povrchu vzorku). Při dalším přiblížení se projeví i silnější síly krátkého dosahu, křivka získá strmý charakter, vrcholem je přiskočení k povrchu, dalším přibližováním dochází ke kladnému ohybu nosníku a křivka získává opačný sklon. Tento směr křivky trvá do té doby, než se hrot začne „odlepovat“ od preparátu. Tentokrát bude následovat přibližovací část, ale opačným směrem, dále bude pokračovat do oblasti přitažlivých sil. [3, s. 16]

Sklon křivky nám dává možnost udělat si představu o elastických vlastnostech povrchu preparátu. Průběh závislosti ovlivňují vnější vlivy, například jestli je vzorek ve vakuu či vodě nebo má kontaminovaný povrch. Lineární část F-d křivky znázorňuje nárůst síly na modulu pružnosti systému, tudíž záleží i na materiálu nosníku. S modulem pružnosti v tahu souvisí povrchové napětí: [3, s. 16]

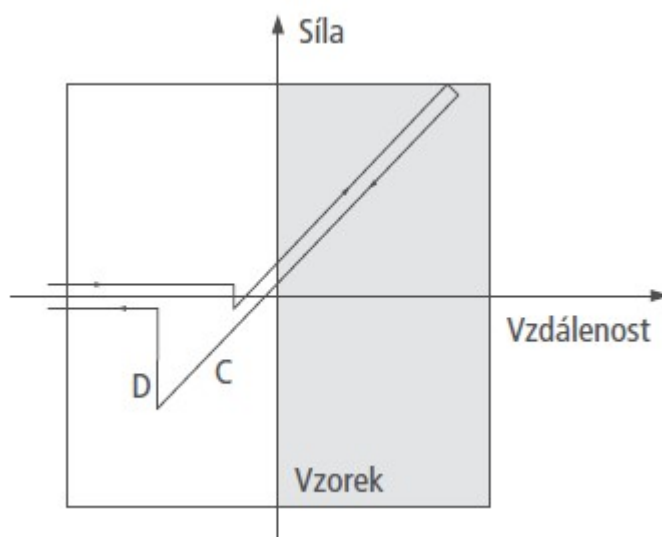
$$\sigma = \frac{F}{S}$$

,kde F je normálová síla působící na povrch o ploše S .



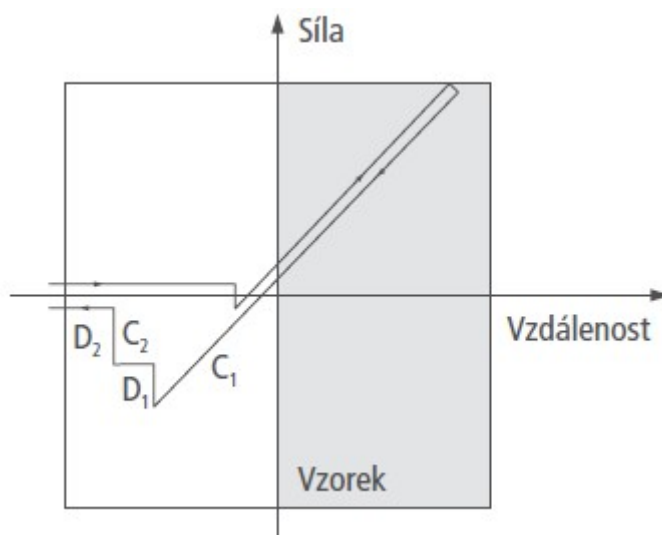
Obr. č. 16 - F-d křivka – vzorek ve vakuu

[3, s. 16]



Obr. č. 17 - F-d křivka – vzorek ve vzduchu

[3, s. 16]



Obr. č. 18 - F-d křivka – kontaminovaný povrch

[3, s. 16]

Na **Obr. č. 16–18** jsou znázorněny tři F-d křivky, které zaznamenávají silové pole působící mezi hrotem a vzorkem po dobu jednoho měření v různých prostředích. Začátek křivky značí první část (přiblížení), jedná se o rovnoběžku s osou znázorňující vzdálenost mezi hrotem a vzorkem, hrot se nedotýká povrchu. Místo, kde dochází ke kontaktu je označeno písmenem A. Hrot se nyní přiblížil do takové blízkosti povrchu vzorku, že zde působí van der Waalsova síla. Při další extenzi skeneru dochází k ještě většímu průhybu nosníku, křivka téměř lineárně roste ve směru dráhy hrotu – část označená písmenem B. Po úplné extenzi se skener začíná vracet, ohyb nosníku kopíruje stejnou část křivky B. Bod D

je místem „odtrhnutí“ hrotu od vzorku. Velikost síly v bodě D , je rovna velikosti síly vzniklé v důsledku existence povrchového napětí vzorku. Po „odtrhnutí“ hrotu od vzorku nedochází k průhybu nosníku, křivka je opět rovnoběžná s osou x (vzdálenost). Úseky CI , $C2$, $D1$ a $D2$ jsou charakteristické pro kontaminovaný povrch. [3, s. 17]

2.4 Další zobrazovací módy

2.4.1 SMM

Mapování fyzikálních vlastností materiálů, jako jsou: impedance, kapacita, dielektrické konstanty, hustota dopantů atd. v řádech nanometrů, je velmi zajímavé pro průmysl materiálů a polovodičů. Toto mapování není však tak jednoduché jako zobrazování topografie, protože v mnoha případech jsou tyto vlastnosti ukryty ve struktuře materiálu a nejsou vidět na povrchu. Vyžaduje to nových postupu „vidět skrz“ a přitom dosáhnout dostatečné citlivosti a rozlišení. [4, s. 1]

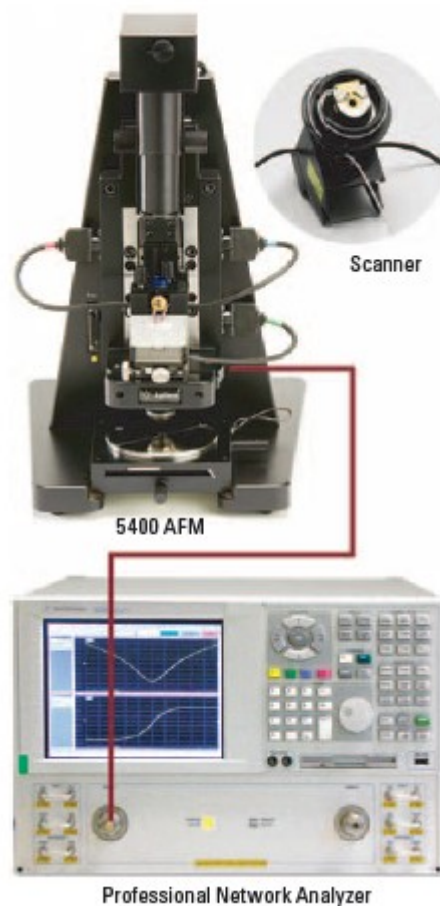
S vynálezem skenovací tunelové mikroskopie (STM) a mikroskopie atomárních sil (AFM), se na bázi STM a AFM vyvinula spousta nových technik s cílem zkoumat nové vlastnosti materiálů. Mezi ně patří skenování blízkého pole pomocí skenování mikrovlnné mikroskopie (SMM), skenování kapacitní mikroskopie (SCM), skenování odporové mikroskopie (SSRM), mikroskopie elektrostatických sil (EFM), proudové nebo vodivé AFM (CSAFM) a mikroskopie Kelvinových sil (KFM). Zatím co každý z metod ukázala své výhody a nevýhody, SMM a SCM ukázaly nejslibnější potenciál pro průmyslové aplikace a vědecký výzkum. [4, s. 1]

Použitím mikrovln jako média, SMM měří elektromagnetickou interakci pomocí sondy nebo štěrbiny testovaného vzorku na stupnici, která je mnohem menší než vlnová délka záření. SMM založené na STM nebo AFM používá obvykle kovovou nebo pokovenou sondu s koaxiálním rezonátorem. Vlastnosti materiálu byly získány z frekvenčního posunu nebo změnou faktoru jakosti z rezonance. Citlivost a rozlišení jsou však velmi omezeny, kvůli malému poměru signálu ku pozadí. [4, s. 1]

AFM na bázi skenování kapacitní mikroskopie byla primárně pro zkoumání polovodičů, měření dvojdimenzionální hustoty dopantů. Pracovní frekvence je 915 MHz, běžně se využívá kapacitní senzor RCA, který detekuje kapacitou vyvolaný posun

frekvence. Ve skutečnosti SCM měří změny kapacity než kapacitu, způsobené úbytkem napětí, známe jako dC/dV , který za určitých podmínek koreluje s hustotou dopantů. Tato metoda je však široce používána u kvalitativního způsobu kvůli nedostatku kvantifikačního procesu. Kapacitní mapování je velmi omezené v důvodu rozptylové kapacity. [4, s. 1]

Proto byla zavedena nová metoda skenování mikrovlnné mikroskopie SMM. Integruje síťovou analýzu mikrovlnné komunikace se zobrazováním ve vysokém rozlišení pomocí AFM. Metoda je schopna zobrazit nejen impedanci, kapacitu, dielektrické konstanty různých materiálů, ale taky hustotu dopantů u polovodičů jako SCM. Díky speciálnímu uzavřenému rezonančnímu obvodu, je jeho citlivost a odstup signálu od šumu je výrazně zvýšena. [4, s. 1]



Obr. č. 19 - Propojení AFM se síťovým analyzátozem

[4]

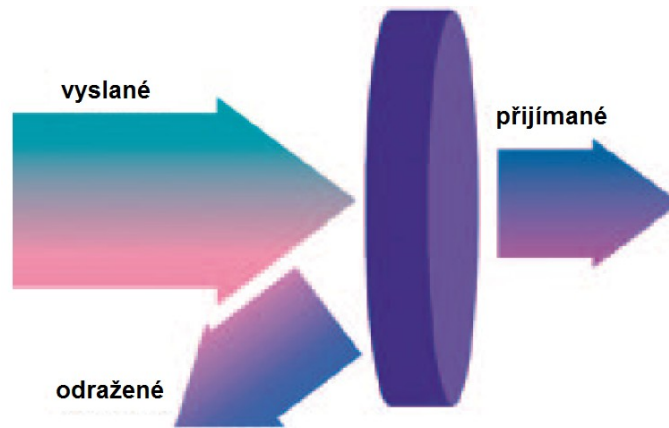
2.4.1.1 Nastavení

Skenování mikrovlnné mikroskopie se skládá z AFM mikroskopu propojeného s vektorovým síťovým analyzátozem (**viz. Obr. č. 19**). Mikrovlnný signál je odeslán přímo ze síťového analyzátoru a přenášený pomocí rezonančního obvodu vodivé sondy AFM, která je v kontaktu se snímaným vzorkem. Sonda slouží zároveň jako přijímač a zachytí odražené vlny z kontaktního místa. U přímého měření komplexního odrazu pomocí síťového analyzátoru, známé jako parametr S11, je impedance každého bodu vzorku mapována zároveň s topografií povrchu. Polovina vlnové délky impedančního transformátoru prochází přes 50Ω zátěž a tvoří uzavřený rezonanční obvod. V kombinaci se zvýšenou maximální detekcí, tento obvod výrazně zvyšuje dynamický rozsah a zvyšuje citlivost měření impedance. S překrývajícím nízkofrekvenčním modulací, změny kapacity v důsledku vyčerpání nositelů v polovodičovém vzorku nebo dC/dV, je možné zároveň zaznamenat AC módem obsahujícím digitální uzamknutí zesilovače. [4, s. 2]

Nová verze programu PicoView řídí sběr dat ze všech vstupů, včetně topografie z AFM modulu, amplitudy a fáze odrazu ze síťového analyzátoru a dC/dV složky z AC modulu. Software ukládá všechna data v hloubce barev 32bit, spíše než v 16bit, která je široce používaná v jiných metodách mikroskopie skenující sondou. To zcela překonává omezení rozsahu dat a rozlišení pro extrémně citlivé měření. S potřebnými kalibračními standardy je systém schopen provádět kvalitativní měření kapacity a hustoty dopantů. [4, s. 2]

2.4.1.2 Princip

Detailní teorie skenování mikrovlnné mikroskopie by měla zahrnovat elektromagnetickou interakci sondy a vzorku v kontaktním bodě a teorii přenosových linek mikrovln síťového analyzátoru. To je ovšem nad rámec mého zaměření. Zjednodušeně to může být chápáno pomocí optické analogie. Jak je zobrazeno na **Obr. č. 20**, když dopadá světlo na objekt, část světla se odrazí a část projde skrz. Tím, že se měří množství světla odraženého nebo přeneseného, můžou být spočítány optické vlastnosti objektu. Při použití stejného principu u mikrovln okolo několika GHz, měřené dopadající a odražené vlny nebo přijímané vlny mohou poskytnout podrobné informace o vlastnostech materiálu. [4, s. 2]



Obr. č. 20 - Optická analogie mikrovlnné analýzy

[4]

Dvouportový profesionální síťový analyzátor je schopen měřit obojí (vysílání a odraz, přijímání). V odrazovém módu (S11 měření), lze měřit komplexní odraz mikrovln Γ z kontaktního místa a může být zapsán:

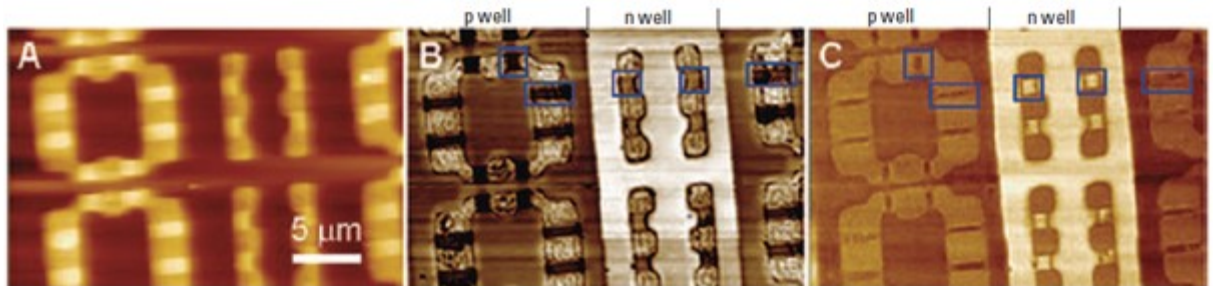
$$\Gamma = \frac{V_{\text{odražené}}}{V_{\text{vyslané}}} = \frac{Z_L - Z_0}{Z_L + Z_0}$$

, kde $V_{\text{vyslané}}$ a $V_{\text{odražené}}$ je vyjádření vyslaných a odražených vln a Z_L a Z_0 jsou impedance testovaného vzorku a charakteristická impedance přenosového vedení. Maximální citlivosti Γ je dosaženo rezonancí, kde impedance testovaného vzorku má charakteristickou impedanci 50 Ω . V blízkosti rezonance, měřený komplexní odraz přímo koreluje s impedancí vzorku v kontaktním místě. Malé změny v mírně neshodném impedančním signálu mohou být odstraněny z pozadí, což má za následek velmi vysokou citlivost. Kolísání odporu při měření impedančního signálu se může promítnout změnou kapacity vzorku v kontaktním bodě. To lze upravit vhodnou změnou fázového posuvu. Následně po kalibraci může být získána kapacita spolu s topografií povrchu. [4, s. 2]

2.4.1.3 Experimenty

Pro testování schopností SMM bylo vybráno několik vzorků. Výsledky jsou zobrazeny na příložených snímcích. Byly použity obě kovové Pt/Ir sondy a cantilevery Si cantilever potažený Pt. Poloměry zakřivení vrcholů těchto sond bylo 10 až 20 nm. Jejich jmenovité pružinové konstanty byly odhadnuty na 0,1 až 0,2 nN/nm. [4, s. 2]

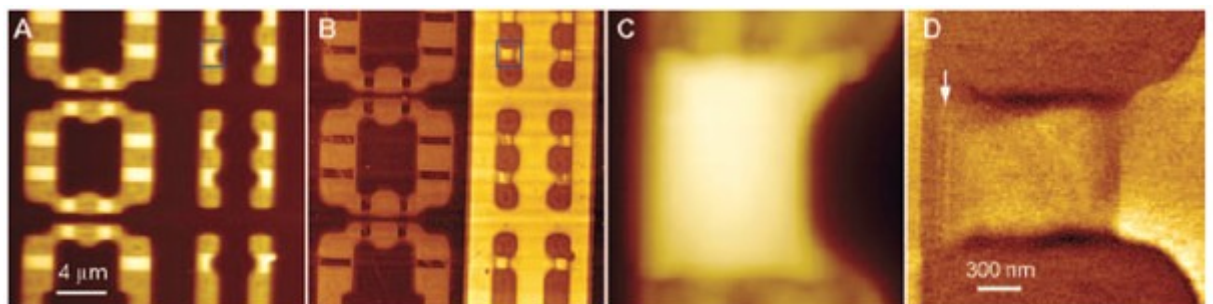
SRAM se běžně používá k testování funkčnosti skenování kapacitní mikroskopie. SRAM políčko se skládá z 6-ti metal-oxide polovodičových polí tranzistorů (MOSFET nebo prostě FET) se čtyřmi n-typy FET (*p well*) a dva p-typy FET (*n well*). Všechny struktury dopantů jsou pod horní vrstvou oxidu. [4, s. 2]



Obr. č. 21 - Simultánní zobrazení topografie (A), kapacity (B) a dC/dV SRAM čipu. Střídající se *p* a *n well* jsou jasně identifikovatelné v obou zobrazeních – kapacitní a dC/dV. Pět ze šesti tranzistorů jsou vyznačeny v B a C.

[4]

Obr. č. 21 je typické zobrazení SMM topografie, kapacity a dC/dV SRAM čipu. Střídající se *p* a *n well* jsou jasně rozpoznatelné v obou zobrazeních, kapacitní a dC/dV s vysokým kontrastem. Pro strukturu MOS je dobře znatelné, že nízká hustota dopantů má za následek velké změny kapacity vysoký poměr dC/dV. Pět ze šesti tranzistorů jsou modře označeny. Většina FET (*p well*) demonstruje velký kontrast zobrazení kapacity způsobený dielektrickou vrstvou na hradle, jak lze vidět na obrázku 3b. Tato charakteristika dielektrické kapacity hradla byla pozorována i v průřezovém zobrazení MOSFET pomocí SMM. Zobrazení kapacity FET (*n well*) indikuje, že dielektrická vrstva na některém hradle byla poškozena. DC/DV zobrazení (Obrázek 3C) však nic na dielektrické vrstvě hradel nezobrazuje. [4, s. 3]

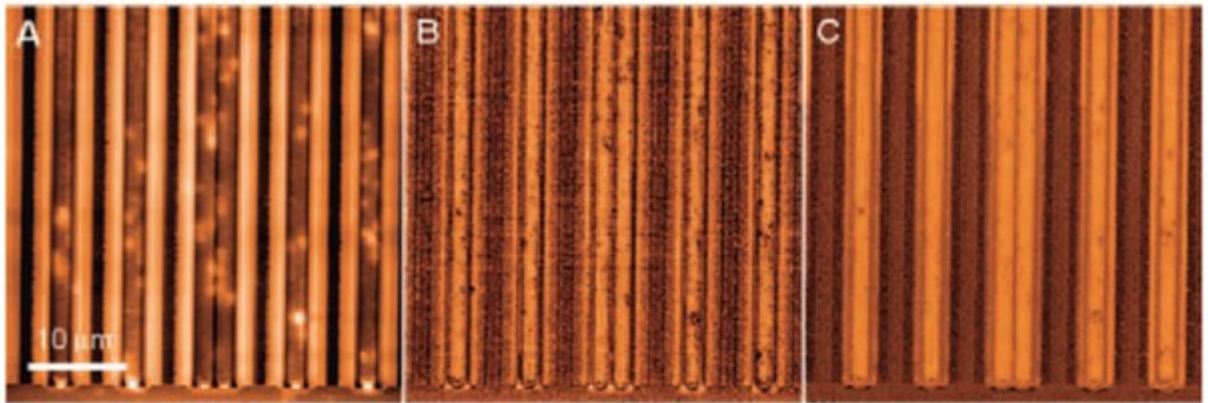


Obr. č. 22 - Topografie (A a C) a dC/dV (B a D) zobrazení SRAM. C a D jsou přiblížené skeny tranzistorů modře označených čtverečku v A/B.

[4]

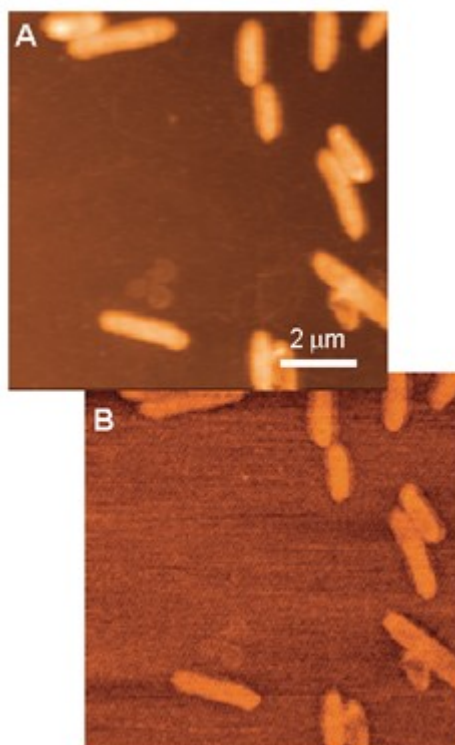
Na **Obr. č. 22** je další soubor zobrazení SRAM získaných pomocí SMM. Zvětšený skeny jednoho z *n well* tranzistorů (modře označený na obrázku 4A a 4B) jsou zobrazeny na obrázku 4C (topografie) a 4D (DC/DV). Šířka pozic odpovídá přibližně poloměru zakřivení použité sondy. To znamená, že metoda SMM je schopna dosáhnout rozlišení blízko maximální velikosti sondy AFM. [4, s. 3]

DRAM ukládá každý bit dat v samostatné pozici kondenzátoru, než jako tomu je u SRAM. Čip DRAM byl také zobrazen pomocí SMM. Zatím co dC/dV obrázek ukázal kruhovou strukturu distribuce dopantů na boční stěně políčka a je v souladu s pozorováním při použití SCM, kapacitní zobrazení odhalilo kruhovou distribuci na vnitřní stěně políčka. [4, s. 3]



Obr. č. 23 - Simultánní zobrazení topografie (A), kapacity (B) a dC/dV (C) pomocí SiGe zařízení. Kapacitní a dC/dV zobrazení umožňuje vidět struktury dopantů, které nelze vidět pomocí topografie.

[4]



Obr. č. 24 - Zobrazení topografie (A) a odpovídající impedance (B) vysušené buňky bakterie sulfurreducen na zlatém povrchu.

[4]

Zařízení na bázi SiGe jsou relativně nová ve srovnání s těmi založenými pouze na Si. Poskytují vyšší rychlost a výkon. **Obr. č. 23** je typickým zobrazením SiGe zařízení obsahující množství tranzistorů. Kapacitní a dC/dV data jasně odhalila spodní struktury dopantů, které nejsou zobrazeny u topologie. Při porovnání s obrázkem 5C (dC/dV), kapacitní zobrazení vyřešilo některé jemné detaily uvnitř dopantů. [4, s. 3]

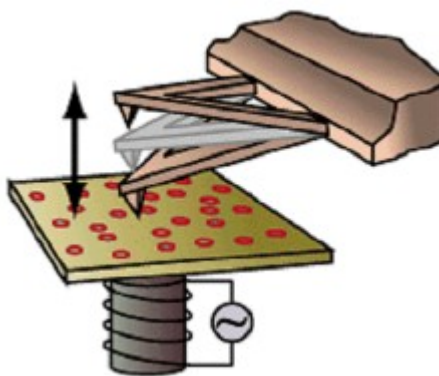
Mikrovlňná mikroskopie lze použít nejen na polovodiče, vodiče, hustotu dopantů a zjišťování dielektrických vlastností, ale taky na izolanty a dokonce i na biologické vzorky pro měření impedance. Koeficient odrazu na izolátoru vyhodnocuje síťový analyzátor a odráží změny impedance v kontaktním místě. **Obr. č. 24** ukazuje tenhle příklad. Vzorek je vyroben z vysušených bakterií sulfurreducen na zlatém podkladu. Údaje o impedanci porovnávají vlastnosti buněk v topografii. [4, s. 3]

2.4.1.4 Shrnutí

Mikrovlňná mikroskopie kombinuje citlivé měření impedance, vektorový síťový analyzátor a rezonanční obvod pro zobrazování ve vysokém rozlišení pomocí AFM. Slouží

nejen k zobrazování impedance, kapacity a dielektrických vlastností, ale může měřit také různé dopanty u polovodičů. Metoda je široce využívána na vodiče, polovodiče, dielektrické materiály, feroelektrické materiály, dokonce i na biologické materiály pro měření různých vlastností spojených s nepatrnými změnami elektromagnetických interakcí jednotlivých složek vzorku s mikrovlnami, staticky nebo dynamicky. Tyto vlastnosti mohou být pod povrchem a nemusí být viditelné pomocí topografie. Z dosavadních pokusů vyplívá, že skenování vlastností materiálu pomocí mikrovlnné mikroskopie je omezeno pouze ostrostí sondy (hrotu). [4, s. 4]

2.4.2 Režim MAC



Obr. č. 25 - MAC režim

[13]

Magnetický AC režim (**Obr. č. 25**) je oscilující AFM technika pro zobrazování, ve které je nosník potažený magnetickou vrstvou a je řízený oscilujícím magnetickým polem. Magnetické pole je generováno elektromagnetem, který je umístěn pod vzorkem. Nosič je řízený vysokou frekvencí a povrch je sledovaný změnami amplitudy nebo fáze oscilace. Jelikož je nosník buzený přímo magnetickým polem, jsou eliminovány chvění držáku nosíku. Neexistuje rezonance v pozadí. Signál šumu je vylepšen, což znamená, že mohou být užity menší amplitudy. Tím se sníží poškození vzorku a chrání povrch sondy. [13, s. 1]

Vlastnosti AC režimu:

- Vyšší rozlišení AC režimu v tekutinách
- Navrženo pro jednoduché operace v tekutinách
- Malé kontaktní síly pro extrémně choulostivé vzorky
- Pracuje ve vzduchu i v kapalinách se stejným nosníkem

- Simultánně pracuje s: kontrolou prostředí, kontrolou teploty, elektrochemickou kontrolou

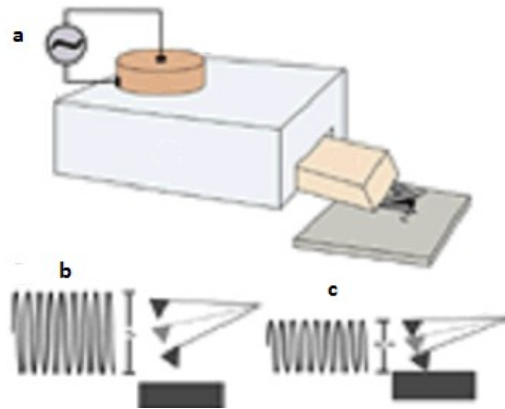
2.4.3 Režim MAC III

Režim MAC III je jemná, nedestruktivní AFM metoda, která byla vynalezena pro velmi choulostivé vzorky. Tento režim je užitečný v oblastech, kde je nutné dosáhnout velkého rozlišení a citlivých sil. To je zapotřebí nejčastěji v biologii, u výzkumu polymerů a povrchů. MAC III významně rozšiřuje schopnosti AFM. Tento režim umožňuje zobrazovat submolekulární struktury, které nemohou být zobrazeny jinou AFM technikou. Uživateli nabízí tři nastavitelné zesilovače, které dovolují vyšší přesnost a přizpůsobivost. Další výhodou je rychlejší dosažení výsledků. První zesilovač může být pout pro AC režim, druhý pro KFM a EFM a třetí pro režimy vyšší harmonické síly nosníku – všechny tři simultánně. Tato technologie zesilování pomáhá eliminovat rušivé odezvy, které mohou být generovány držákem nosníku, obklopující tekutinou nebo vzorkem samostatným. Proto je tu menší šum a nosník může pracovat za mnohem menších amplitud. Zkoumání vyšších harmonických umožňuje možnost pracovat za frekvencí až 6 MHz. Zobrazování vyšších harmonických může sloužit k získání dalších informací o mechanických vlastnostech zobrazovaného povrchu. [13, s. 1]

2.4.4 Akustický AC

V AC režimu se nosník blíží své rezonanční frekvenci. Pracuje v pokleповém nebo nekontaktním režimu, což záleží na režimu síly a na vzdálenosti hrotu a vzorku. Interakce mezi hrotem a vzorkem je převážně vertikální, boční síly jsou zanedbatelné. To znamená, že AC režim netrpí znehodnocením hrotu či vzorku, které je někdy pozorováno po četném skenování kontaktním režimem. Je to vhodná technika pro zobrazování měkkých vzorků. Interakce mezi hrotem a vzorkem způsobí změny amplitudy, fáze a rezonanční frekvence oscilace nosníku. Prostorová změny mohou být zobrazeny topologií nebo obrázkem působení (amplituda nebo fáze), které mohou být simultánně shromažďovány. Systém monitoruje rezonanční frekvenci nebo amplitudu nosníku a udržuje ji konstantní pomocí obvodu zpětné vazby. Ta pak řídí pohyb skeneru nahoru a dolů. Pohyby skeneru při každé poloze sondy se užívá ke generování topografických dat. Amplitudové zobrazení vzniká generováním změn amplitudy při každé změně polohy sondy. Fázové údaje jsou výsledkem

fázového zpoždění mezi vstupem AC jednotky a výstupem oscilace nosníku v každé poloze sondy. Kontrast ve fázovém zobrazení, způsobený rozdíly v materiálových vlastnostech, může poskytovat velmi užitečné informace. Amplitudovým a fázovým zobrazením je možné identifikovat jemné morfologické znaky. [13, s. 2]

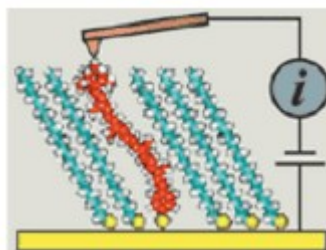


Obr. č. 26 - Akustický AC režim: a) snímač uchycený k uložení nosníku se užívá k vybuzení nosníku k oscilaci; b) amplituda oscilace, když je hrot daleko od povrchu; c) redukováná amplituda, když se hrot přiblíží k povrchu

[13]

Jsou dva způsoby jak přivést nosník k oscilaci. Jednou cestou jsou nepřímé vibrace, ve kterých je nosník vybuzen vysokou frekvencí akustických vibrací od piezoelektrického snímače připevněného k držáku nosníku. To se nazývá Akustický AC režim (AAC). Druhá, více upřednostňovaná metoda, která je mnohem čistší a jemnější než akustická metoda je metoda přímých vibrací, ve které je nosník buzen přímo, aniž by muselo vibrovat uložení nosníku nebo jiné části. To se nazývá magnetický AC režim. [13, s. 2]

2.4.5 Snímání proudu

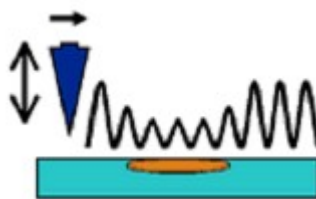


Obr. č. 27 - Princip snímání proudu

[13]

Režim snímání proudu využívá standardního AFM kontaktního režimu po ultra ostrém hrotu na AFM nosníku, který je potažen vodivým materiálem, aby simultánně snímal vodivost a topografii vzorku. Aktivací zdroje napětí mezi vzorkem a vodivým nosníkem je generován proud. Údaje o snímaném proudu může být využito k sestavení prostorového zobrazení vodivosti. SCAFM se osvědčilo jako užitečné při spojení I/V spektroskopie a experimentů s kontaktními silami, stejně tak jako studii kontaktního potencionálu. SCAFM je kompatibilní s měřením na vzduchu, za kontrolovaného prostředí a měření s kontrolou teploty. Kombinací SCAFM s volitelnou kontrolou prostředí molekulárního zobrazování je vliv vlhkosti na vzorek redukován, což dává mnohem lepší výsledky. SCAFM je aplikovatelné na různé druhy oblastí. Je užitečné ve studiích molekulárního rozpoznávání a může být použito k prostorovému rozlišení elektronických a iontových procesů membrán buněk. [13, s. 3-4]

2.4.6 Modulace síly



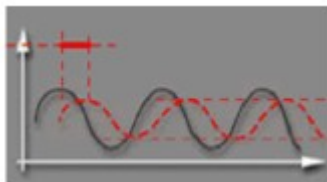
Obr. č. 28 - Princip modulace síly

[13]

Modulace síly je rychlá, velmi citlivá metoda, která slouží k zobrazování a měření mechanických vlastností povrchu, včetně tvrdosti a elasticity. Během kontaktu s povrchem vzorku je do AFM nosníku přiváděn modulovaný řídicí signál. Během měření se zaznamenává změna amplitudy a fázového zpoždění. Díky modulaci síly lze simultánně měřit topografii povrchu, materiálovou elasticitu nebo tvrdost. Při aplikaci modulovaného signálu do AFM nosníku, budou mít elastické materiály relativně vyšší amplitudu než tvrdé materiály, protože hrot může promáčknout elastický materiál. [13, s. 4]

Tento režim se prosadil především ve studiích medicíny, polymerů, v experimentech s polovodičovými materiály a výzkumech materiálů včetně kompozitu. Modulace síly je kompatibilní s měřením na vzduchu nebo v tekutinách, za kontroly prostředí, kontroly teploty, MAC režimu a elektrochemie. [13, s. 4]

2.4.7 Fázové zobrazování



Obr. č. 29 - Změny fáze

[13]

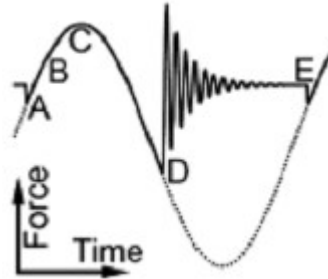
Fázové zobrazování je výkonná technika dynamické síly, která může odhalit mnoho unikátních mechanických a chemických vlastností vzorku v měřítku nanometrů. Nosník osciluje vertikálně v blízkosti jeho mechanické frekvence rezonance zatím, co je v těsné blízkosti vzorku. Jak se hrot dostává do těsné blízkosti vzorku, amplituda oscilace nosníku se snižuje. Změna amplitudy je měřena a je použita k sledování změn topografie povrchu a nerovnosti vzorku. Simultánně, jak hrot vnikne do oblasti rozdílných složení, změna fáze, úměrná k fázi řídicího signálu, je měřena a zaznamenána. Tato změna fáze je velmi citlivá na změny ve vlastnostech materiálu, včetně tvrdosti materiálu, elasticity a adheze. Fázové posuny jsou měřeny a zobrazovány velmi přímým způsobem, který napomáhá kvantitativní analýze a interpretaci. [13, s. 4]

Jak anorganické tak organické vzorky mohou být zkoumány pomocí fázového zobrazování. Fázové zobrazování bylo vymyšleno, aby bylo užitečné zvláště pro mapování různých komponent kompozitních materiálů, a ke studování změn ve složení a znečištění materiálů, a k měření adheze, povrchové tvrdosti a elasticity. Je aplikováno ve studiích tenkých vrstev, v materiálech a kompozitních charakteristikách. [13, s. 5]

Fázové zobrazování je zahrnuto s akustickým AC režimem a MAC režimem. Studie pomocí fázového zobrazování mohou být vedeny s nebo bez kontroly teploty, na vzduchu, v tekutinách a dokonce za kontroly prostředí. [13, s. 5]

Fázové zobrazování může sloužit k odhalení materiálových vlastností, které nemohou být pozorovány v povrchové topografii, a může identifikovat vlastnosti, které mohou být jinak zatemněny topografií. Je to citlivá, kvalitativní metoda AFM, která je často více vhodná a jemnější než jiné metody vlastností povrchů, které jsou založeny na operaci kontaktního režimu. [13, s. 5]

2.4.8 Pulsující síla

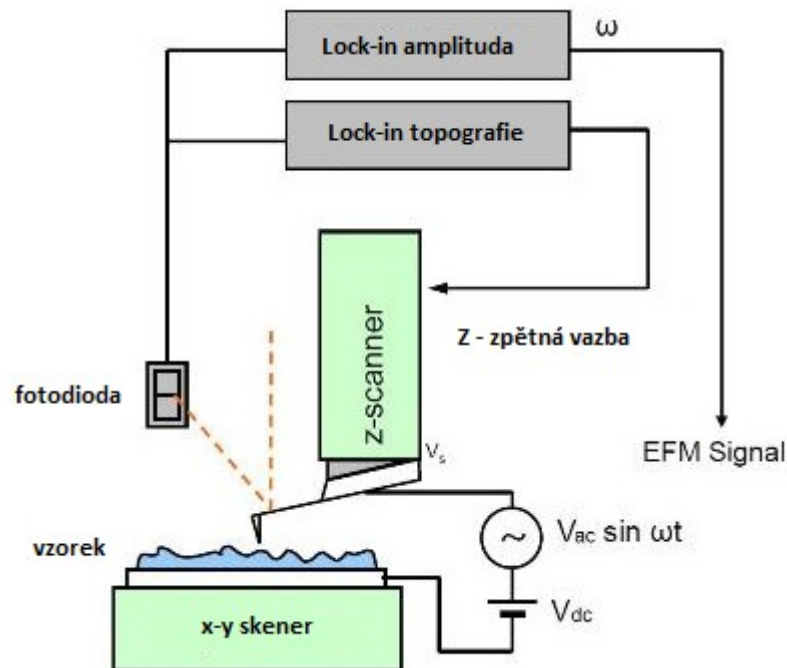


Obr. č. 30 – Znárodnění pulsující síly

[13]

Režim pulzující síly je technika, která mapuje tvrdost povrchu a adhezi jako dodatek k topografii v kontaktním režimu. V režimu pulzující síly je aplikována sinusovka o nízké frekvenci (500 Hz až 1 kHz) na z-piezo, aby přivedl hrot z a do kontaktu s povrchem. Jak je vidět na **Obr. č. 30**, hrot se dostává do kontaktu v bodě A. Síla se zvyšuje, jak piezo tlačí hrot dál až do bodu C, kde je dosažena maximální síla. Pak piezo táhne hrot pryč. V bodě D se hrot odtrhne od povrchu. Následná volná oscilace cantileveru je tlumena a pokračuje řízení sinusovkou. V bodě E začíná další cyklus. Tvrdost a adheze může být získána z každého modulačního cyklu. Sklon mezi body B a C se používá k mapování změn tvrdosti povrchu, zatímco síla, která způsobí odtrhnutí hrotu v bodě D je měřena, aby byla vidět adheze mezi hrotem a povrchem. Režim pulzující síly je efektivní zobrazovací metoda pro směsi polymerů, kompozitní materiály a lepkavé povrchy. [13, s. 5]

2.4.9 Mikroskopie elektrostatických sil



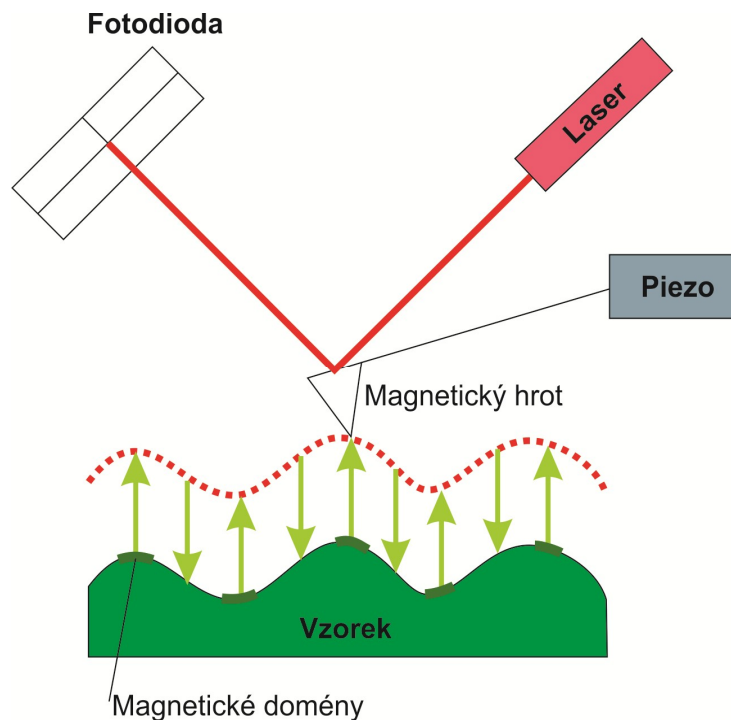
Obr. č. 31 - Princip EFM

[14]

Mikroskopie elektrostatických sil měří lokální elektrostatické působení mezi vodivým hrotem a vzorkem pomocí Coulombových sil. Jak hrot skenuje povrch, je k němu připojen zdroj napětí. Různé plochy povrchu mohou mít různou odezvu k nabitému hrotu v závislosti na jejich lokálních elektrických vlastnostech. Takové změny v elektrostatických silách mohou být detekovány pomocí změny amplitudy oscilace a fáze AFM sondy. Protože elektrostatické síly ovlivňují na větších vzdálenostech než van der Waalovy síly, informace o elektrostatických silách může být oddělena od topografie povrchu jednoduše nastavením vzdálenosti hrot-vzorek. Tudiž elektrické rysy mohou být rozpoznány z topografických rysů. V EFM měření se užívá akustického AC režimu. Program PicoScan přináší jednoduchou cestu k mapování povrchového elektrostatického působení simultánně se zobrazováním topografie. [13, s. 6]

Existuje mnoho oblastí aplikace EFM, např. charakterizování elektrických vlastností povrchu, odhalování vad integrovaného obvodu, měření rozložení konkrétního materiálu na povrchu kompozitu.

2.4.10 Mikroskopie magnetických sil - MFM



Obr. č. 32 - Princip MFM

Mikroskopie magnetických sil měří magnetické struktury/oblasti povrchu při použití magnetického nosníku. Vzájemné působení mezi magnetickým hrotem a povrchem je značně ovlivněno lokálními magnetickými vlastnostmi, když hrot skenuje. Změny magnetických sil mohou být měřeny buď kontaktním režimem nebo režimem AC. Stejně jako EFM, fázové zobrazování z akustického AC režimu poskytuje velmi citlivý způsob mapování magnetického působení. Vytváření ovladačů PicoScan využívá stejný princip a poskytuje uživateli šikovní nástroj k provádění takových měření spolu se zobrazováním topografie povrchu. [13, s. 6]

Je nedestruktivní a vyžaduje minimální přípravu vzorku. MFM může být využita k vyhodnocování magnetických materiálů nebo zařízení nebo k lokalizaci a mapování magnetických vad na různých materiálech a površích.

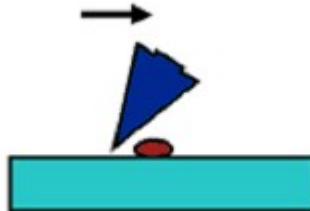
MFM je kompatibilní se zobrazováním v tekutinách nebo na vzduchu a zobrazování za kontroly prostředí a nebo za kontroly teploty. [13, s. 7]

Aplikace MFM zobrazování zahrnuje:

- Media pro uchování dat
- Nanočástice

- Magnetické tenké vrstvy
- Detekce magnetických lemů

2.4.11 Mikroskopie bočních sil

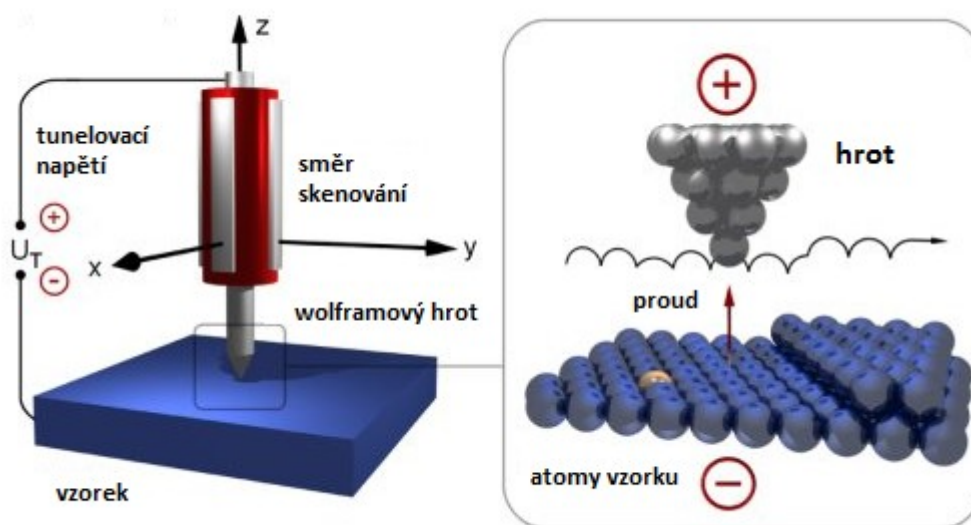


Obr. č. 33 – Znáznornění mikroskopie bočních sil

[13]

Během AFM skenování v kontaktním režimu, když je sonda tažena přes povrch, mohou změny v povrchovém tření a spojitě naklonění způsobit jak kroucení nosníku, tak zvýšení sil působících na nosník, které jsou podobné ploše povrchu vzorku. Boční síly způsobují boční vychýlení nosníku, které je snímáno fotodetektorem a využito k vytvoření zobrazení bočních sil způsobem, který je podobný ostatním metodám AFM zobrazování odchylek. LFM je užitečná při studiu povrchů, které mají změny ve tření. Protože jak tření povrchu, tak topologie mohou přispívat ke změnám bočního vychýlení. Aby vynikly rozdíly mezi LFM a AFM, měly by být tyto metody měřeny simultánně. [13, s. 7]

2.4.12 STM



Obr. č. 34 - Princip STM

[14]

STM využívá ostrého vodivého hrotu a zdroje napětí mezi hrotem a vzorkem. Když je hrot přivede do blízkosti vzorku, elektrony mohou „tunelovat“ přes úzkou mezeru buď od vzorku k hrotu, nebo od hrotu ke vzorku v závislosti na polaritě zdroje napětí. Tento procházející proud se mění se vzdáleností hrotu od vzorku, slábne exponenciálně se vzdáleností, což dává STM pozoruhodnou přesnost v nastavování polohy hrotu (méně než Angstrom vertikálně, atomové rozlišení bočně). Pro uskutečnění tunelování elektronů musí být, jak hrot, tak vzorek musí být vodivé. Proto je velkou nevýhodou, že nemůže být použito na skenování nevodivých materiálů. [13, s. 7]

Zobrazování povrchu může být prováděno ve dvou režimech: s konstantním proudem nebo konstantních výškou. V režimu **konstantního proudu** se využívá zpětné vazby k nastavení výšky skeneru a tím se udržuje konstantní proud. Když systém zaznamená nárůst procházejícího proudu, nastavuje napětí aplikované na piezoelektrický skener, aby skener zvedl hrot a zvětšil vzdálenost hrot-vzorek. Výška skeneru je měřena v každé poloze povrchu vzorku a představuje topografické zobrazení. Rychlost skenování je omezena rychlostí odezvy zpětné vazby a proto to trvá déle zobrazit nepravidelný povrch větších rozměrů. V režimu **konstantní výšky** hrot skenuje v konstantní výšce nad vzorkem a procházející proud se mění podle topologie a podle elektrických vlastností povrchu

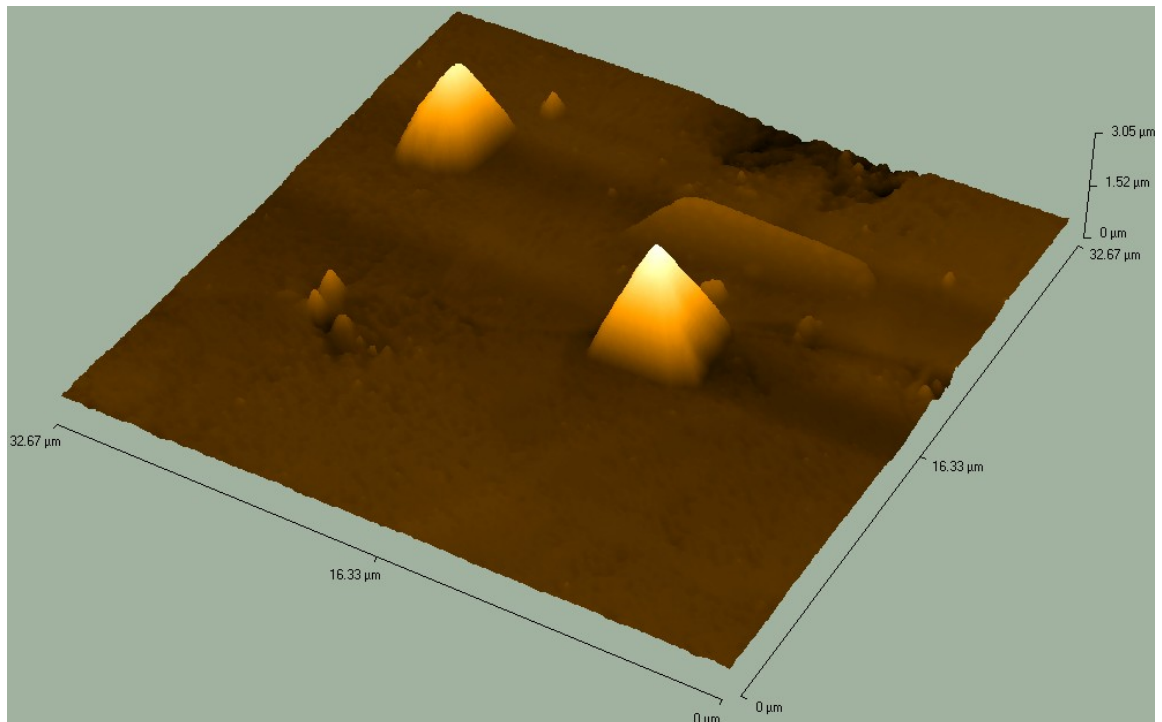
vzorku. Výhodou režimu konstantní výšky je, že získávání dat je rychlejší, protože nemusí posouvat skener ve vertikálním směru. [13, s. 8]

Přesně řečeno STM procházející proud je vztažen povrchové elektronické hustotě stavů, tj. k číslu obsazených nebo neobsazených stavů v blízkosti Fermiho hladiny uvnitř oblasti energie určené zdrojem napětí. Takže STM měří pravděpodobnost konstantního procházení místo fyzické topografie povrchu. STM spektroskopie, v pohledu vztahu proud-napětí v konstantní vzdálenosti hrot-vzorek nebo vztahu proud-vzdálenost za konstantního zdroje napětí, je užitečný nástroj ke studiu elektronových struktur a vlastností povrchu vzorku v atomovém rozlišení. [13, s. 8]

2.5 Artefakty

2.5.1 Zrcadlení hrotu, konvoluce

Každý bod obrazu je určen prostorovou konvolucí povrchu vzorku a hrotu a ne pouze topografií zkoumaného materiálu. Artefakt zrcadlení hrotu se projevuje nejčastěji při skenování povrchu, který obsahuje užší a ostřejší struktury, než je šířka hrotu. V tomto případě bude vzorek snímat hrot, tudíž se v obraze projeví povrch hrotu. Vliv zrcadlení lze určit podle toho, zda se v obraze nenacházejí struktury stejného tvaru i orientace. Konečná velikost (šířka hrotu) zapříčiňuje snímání povrchu s vadami, protože na signálu se podílejí všechny blízké atomy, nejvíce však atomy vzorku nacházející se v nejbližší vzdálenosti od hrotu. To však mohou být i atomy, které se nenacházejí přímo v bodě, který měříme. To bývá způsobeno nedokonalostí hrotu nebo jeho opotřebením. Konečná šířka hrotu je významná při skenování děr nebo prohlubní ve vzorku, kde se nachází hodně blízkých atomů, to může způsobit zkreslení hloubky. [3, s. 18]



Obr. č. 35 - Zrcadlení pyramidového hrotu

[12, s. 102]

2.5.2 Ovlivnění signálu zpětnou vazbou

Chybné nastavení zpětné vazby se také podílí na získání nepřesných dat. Příliš silnou zpětnou vazbou mohou nastat oscilace, které se projeví periodickou strukturou v obraze, kterou však bývá snadné odhalit. Naopak slabá zpětná vazba je rozpoznatelná hůře, pokud skenujeme povrch, který nám není dobře známý. Protože hrot nesleduje detaily, povrch se nám jeví jako hladký. Proto se jí snažíme vyhnout softwarovým nastavením. Například vhodným nastavením amplitudy kmitání se vyhneme artefaktům, způsobeným přichycením hrotu k povrchu vzorku atd. [3, s. 18]

2.5.3 Šum

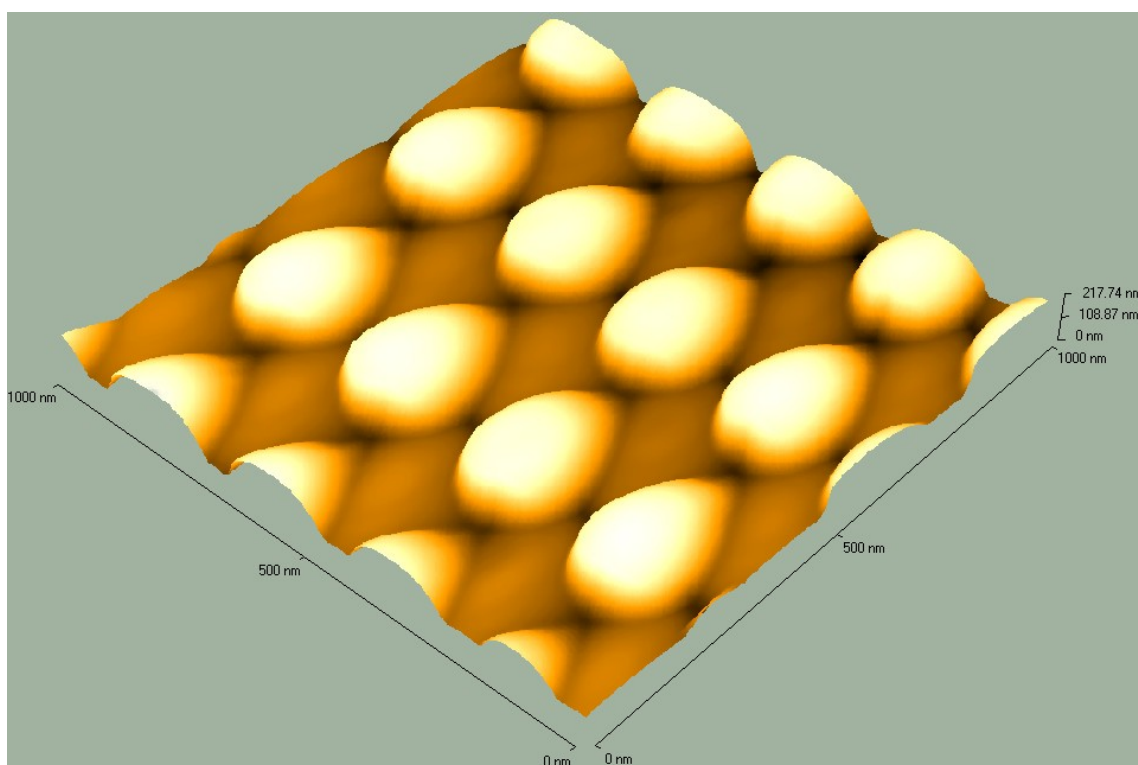
Hlavní příčiny šumu v signále bývají vibrace ventilátorů, pohybující se lidé na pracovišti, pole v okolí vodičů, tepelný drift atd. Tyhle vlivy je potřeba co nejvíce eliminovat, například stíněním elektronických součástek, využitím ochranných krytů, skříní či speciálních stolů. [3, s. 18]

2.5.4 Rigidita vzorku

U nedostatečně pevného vzorku vznikají při jeho zobrazování problémy. Zejména u kontaktního režimu může dojít k utržení materiálu a jeho smýkání, to se projeví na obraze rozmazanou čarou. Také může dojít ke stlačování atomů povrchů hrotem (například u grafitu v důsledku jeho šestiúhelníkové struktury), v obraze jsou pak zachyceny pouze některé atomy. Artefaktům způsobeným rigiditou vzorku se můžeme vyhnout tak, že zvolíme vhodný mód pro skenování. Například měkké vzorky je lépe zobrazovat v nekontaktním režimu. Taky je potřeba vybrat vhodný hrot. [3, s. 19]

2.5.5 Vady nosníku a hrotu

Pro správné nezkrácené zobrazení je důležité, aby nosník a hrot byl symetrický. Nesymetrie se může projevit prodloužením objektů v jednom směru. [3, s. 19]



Obr. č. 36 - Ukázka zobrazení při nesymetrii hrotu

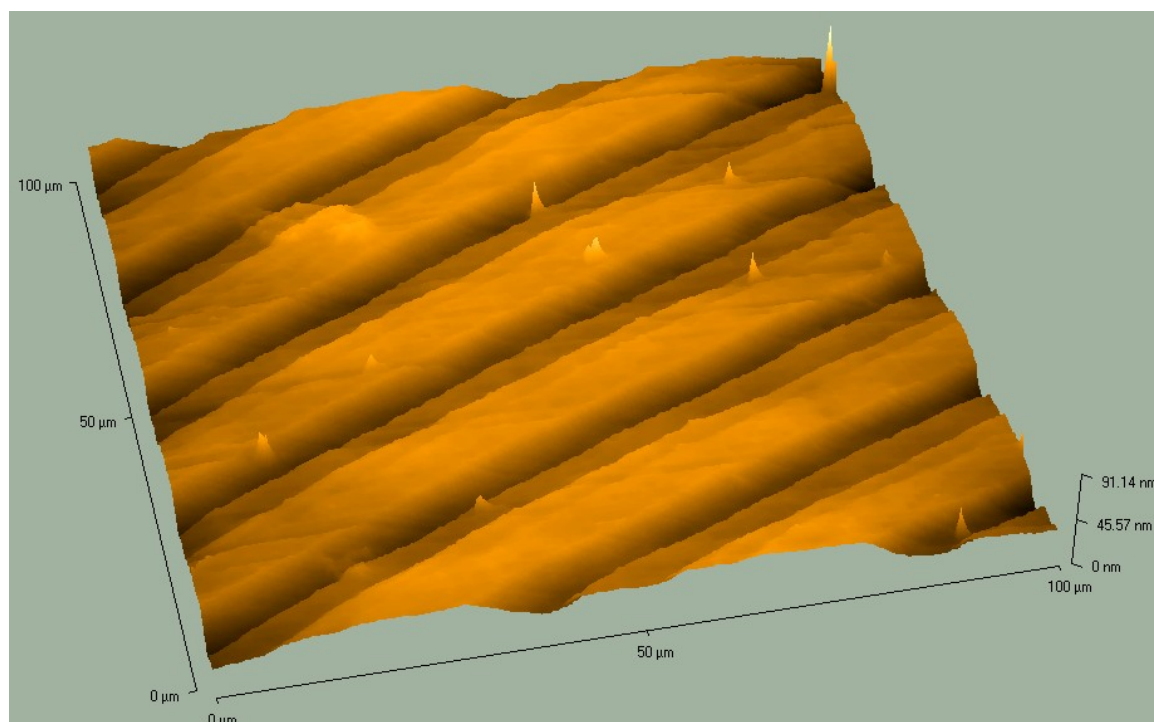
[12, s. 103]

2.5.6 Nabíjení vzorku

Při skenování pomocí AFM v kontaktním i nekontaktním režimu dochází k nabíjení vzorků a tím vzniká elektrostatická síla, která má za následek snížení rozlišení. [3, s. 19]

2.5.7 Interference

U AFM se využívá k detekci ohybu nosníku optické záření. Při zkoumání lesklého povrchu může dojít k odrazu paprsku od vzorku na detektor, který tím ztratí schopnost udržovat zpětnou vazbu (následkem může být poškození nosníku či vzorku). Interference, která vznikne mezi povrchem vzorku a mikroskopem, se může projevit v obraze světlými a tmavými místy. [3, s. 19]



Obr. č. 37 - Proužky způsobené světelnou interferencí

[12, s. 104]

3 ZKOUMÁNÍ LIDSKÉ KREVNÍ BUŇKY

Zkoumání biologických objektů, zejména buněk, mikroskopii skenující sondou (SPM), vyžaduje speciální přípravu. Tato příprava znamená fixaci biologického objektu. Při upevnění se buňka zabije v určitém stádiu vývoje. Pro upínání se používají lihy a aldehydfenoly: methanol, ethanol, glutaraldehyd atd. V současné době se používají speciální konstrukce pro výzkum biologických vzorku a to bez fixace vzorku. Tyto a další SPM techniky pro výzkum buněk mají své výhody a nevýhody.

Cílem zkoumání bylo zjistit morfologické parametry uchycení krevních buněk u neznámějších metod prováděných při SPM, přirozenou adhezi k podkladu, porovnání výsledku a nalezení optimální metody pro zkoumání biologického vzorku.

Cílem zkoumání byla krevní buňka – polymorfonukleární neutrofil (PMN). Pro fixování buněk byl použit methanol a glutaraldehyd. [16]

3.1 Příprava vzorku

Lidská PMN byla izolována z žilní krve zdravého dobrovolníka. Erytrocyty prošly lýzou s fyziologickým roztokem NH_4Cl na 12 minut, 00C . Zbývající granulocyty byly omyty PBS a resuspendovány v HBSS s koncentrací 2,106 buněk / ml. Poté bylo 0,05 ml buněk pro každý test umístěno na skleněnou podložku. Neutrofilů se staly přilnavými. [16]

Upevnění buňky:

Po nanášení buněk a přilnutí na sklíčko (30 minut, 24°C), byly buňky fixovány:

1. Methanolem (0,05 ml, 10 minut)
2. Glutaraldehydem (0,05 ml, 20 minut)

Skvrny byly omyty destilovanou vodou a usušeny na vzduchu.

3.2 Metody zkoumání

Morfologie buněk byla zkoumána pomocí SPM. Zkoumání fixované buňky na vzduchu: byl vybrán kontaktní režim pro zkoumání PMN. V některých případech byly pozorovány zachycení biologického vzorku sondou kvůli příčným silám. Pro minimalizaci tohoto nežádoucího efektu byla zvolena skenovací rychlost 0,5-1 řádek za sekundu. Byla

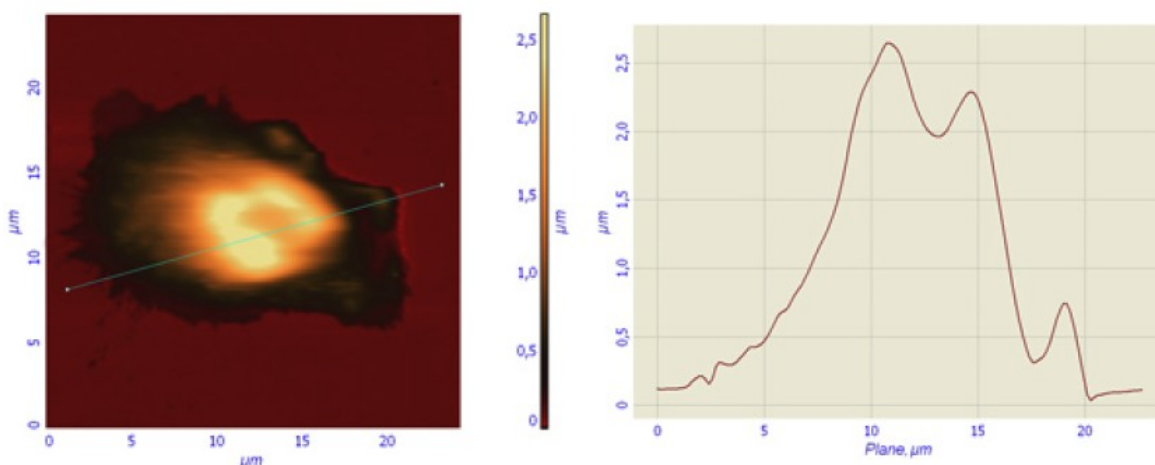
použita kontaktní sonda z křemíku s konstantním pružením 0,03 N/m. Poloměr zakřivení hrotu 10 nm a výška hrotu 10-20 mkm. [16]

Zkoumání živých buněk v kapalině: při zkoumání buněk v kapalině je důležité, aby buňky byly dobře přilnavé k povrchu sklíčka. Při práci s neurofilly bez fixace je dobré použít tlumivý roztok Henks, protože obsahuje ionty vápníku a to způsobuje dobrou přilnavost. [16]

Pro zkoumání byl použit křemíkový nosník s konstantní pružností 0,03 N/m, poloměr zakřivení hrotu 50-60 nm a výška hrotu 10-20 mkm. Rezonanční kmitočet byl zvolen 15-40 kHz. Rychlost snímání byla zvolna na 2 řádky za sekundu. Snížení rychlosti vedlo k poškození vzorku. [16]

3.3 Výsledky zkoumání

Během zkoumání živých buněk se pozorovalo ohraničení buňky, jádro a začlenění granulí v cytoplasmě. Jasně znázorněné jádro bylo zvláště viditelné u laterálního profilu buňky, malá hrana je granule cytoplasmy a dvě velké ohraničení tvoří jádro buňky (**Obr. č. 38**). [16]

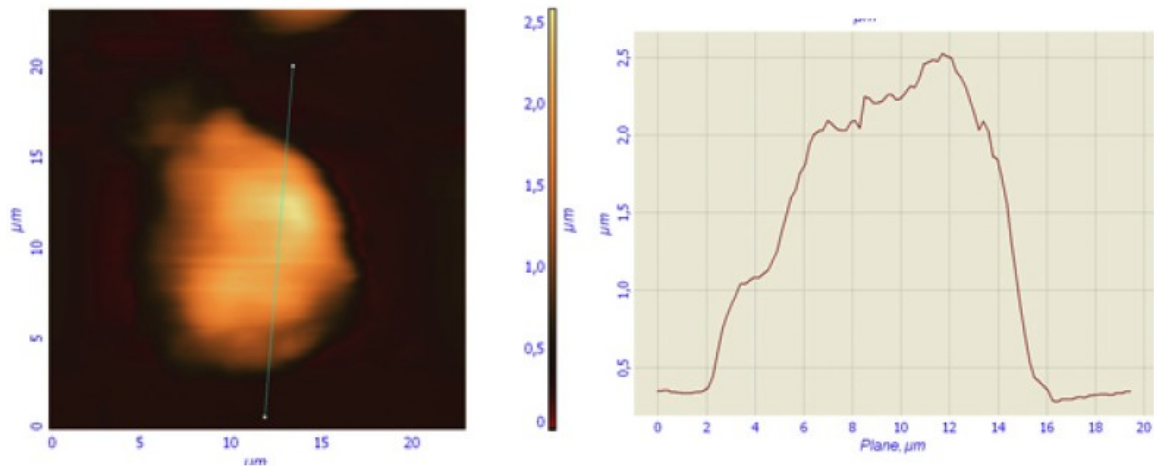


Obr. č. 38 - Žijící polymorfonukleární neutrofilý a profil živých buněk v tekutině získané pokleповým režimem kontaktní Si sondou - CSG11. Rychlost snímání 2 řádky/sec.

[16]

Taky byly pozorovány neutrofilý, kde byly jádra špatně definované, nicméně však byly odhaleny pomocí profilování buňky. Buňky měly kulatý tvar. Prakticky všechny cytoplasmy se objevují soustředěné v blízkosti jádra. To snižuje rozlišení buňky. Granule v cytoplasmě

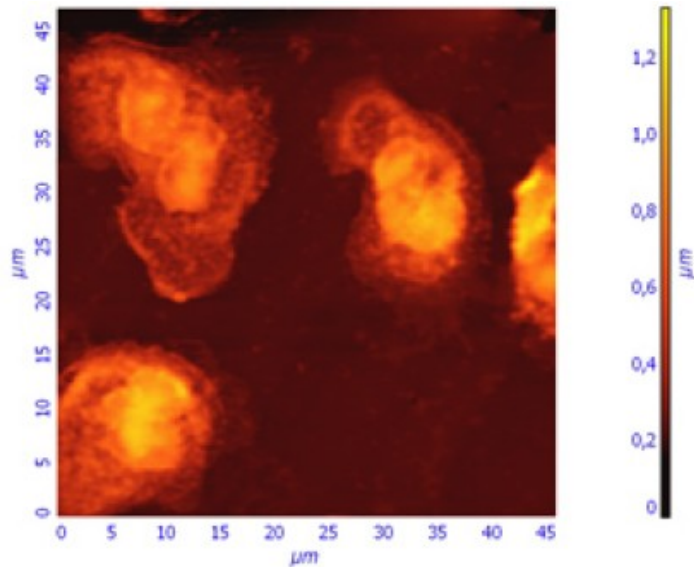
nejdou prakticky identifikovatelné. Buňka má drsný povrch, který může být vidět v profilu buňky (Obr. č. 39). [16]



Obr. č. 39 - Žijící polymorfonukleární neutrofilů a profil živých buněk v tekutině získané poklepným režimem kontaktní Si sondou - CSG11. Rychlost snímání 2 řádky/sec.

[16]

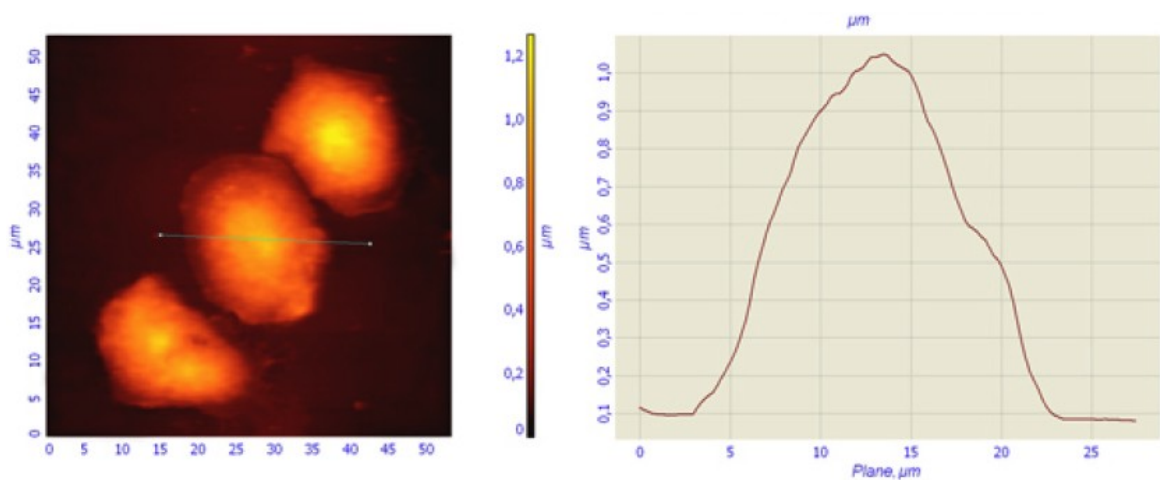
Během zkoumání buněk uchycených v methanolu, byly hranice buněk, granule cytoplazmy a jádra jasně definovány. Buňky uchycené v methanolu ztrácí vodu a zcela se rozšíří po podložce. Prudce se mění morfologické parametry buňky. Rozlišení mikroskopie skenující sondou je vyšší u tvrdých biologických objektů ve vzduchu než u měkkých živých buněk. [16]



Obr. č. 40 – Zobrazení polymorfonukleární neutrofilů uchycené v methanolu zkoumané ve vzduchu kontaktním režimem Si sondou CSG11. Rychlost snímání 1 řádky/sec.

[16]

Během zkoumání buněk uchycených v glutaraldehydu se nenašly žádné výhody toho způsobu uchycení, i přestože se jedná o standardní metodu SPM výzkumu biologických prvků. Buňka uchycená v glutaraldehydu udržuje v sobě vodu a nešíří se po podložce. Její obraz je totožný s obrazem živé neutrofilů. Hranice buněk jsou dobře viditelné. Nicméně jádro a granule nejsou identifikovatelné (**Obr. Č. 41**). Pouze drsnost buňky, která u methanolu nebyla znatelná, je tady dobře viditelná. Rozměry buněk uchycené v glutaraldehydu se liší od těch, co byly uchyceny v methanolu. [16]



Obr. č. 41 - Zobrazení polymorfonukleární neutrofilů uchycené v glutaraldehydu zkoumané ve vzduchu kontaktním režimem Si sondou CSG11. Rychlost snímání 0,5 řádky/sec.

[16]

Statistická analýza ukazuje, že výška a boční velikost živých buněk se podstatně liší od fixních rozměrů.

	Živé buňky	Buňky uchyceny v methanolu	Buňky uchyceny v glutaraldehydu
Laterální velikost buněk (mkm)	14,55 ± 0,55 *	16,72 ± 0,41 *	18,25 ± 0,48*
Výška buněk (mkm)	2,133 ± 0,112 **	0,664 ± 0,026 **	1,031 ± 0,049 **

Tab. č. 1 – Morfologické parametry polymorfonukleárních neutrofilů

*F=15,11($\nu_{\text{vstup}} = 138,1$; $\nu_{\text{výstup}} = 9,136$;) $p < 0,001$

**F=99,26($\nu_{\text{vstup}} = 214,1$; $\nu_{\text{výstup}} = 2,15$;) $p < 0,001$

3.4 Shrnutí

Velikosti buněk byly změněny metodou fixace: uchycení pomocí methanolu mění výšku a uchycení pomocí glutaraldehydu laterální velikost. Ale užití fixace má několik výhod oproti živým buňkám:

- a) Dlouhé skladování a opakované zkoumání vzorku po určitých intervalech.
- b) Možnost přepravy.
- c) Vysoké laterální rozlišení při zkoumání detailů buněk.

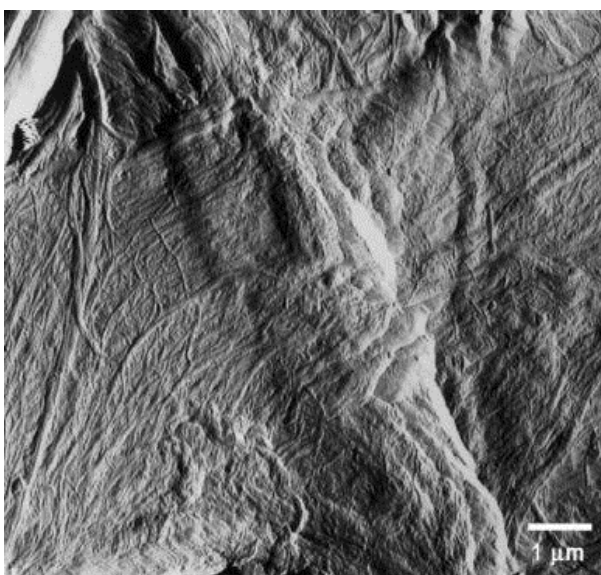
Z toho vyplývá, že pro výzkum buněčných procesů a morfologických změn je výhodnější zkoumání v kapalném prostředí živých vzorků. A pro vizualizaci malých detailních změn (především jádra a granulátu v cytoplazmě) je lepší použít metody fixace v methanolu. [16]

4 VYUŽITÍ AFM V BEZPEČNOSTNÍ OBLASTI

4.1 Analýza dokumentů

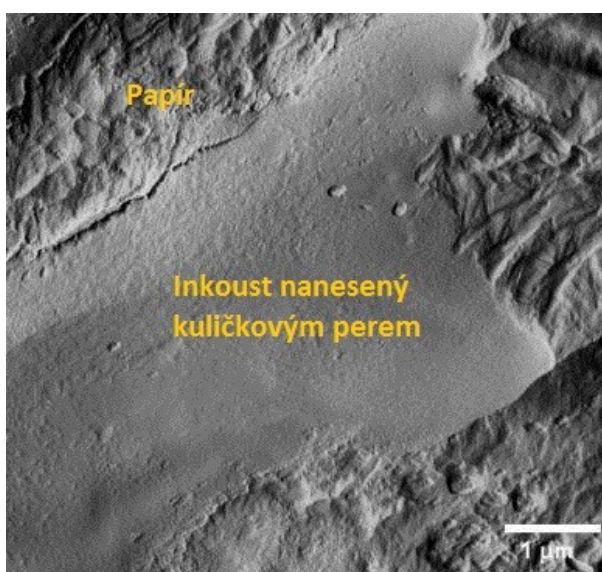
Forenzní zkoumání dokumentů pomocí AFM umožňuje:

- Vizualizaci nanesení inkoustu a rozlišování jeho původu
- Stanovení pořadí barev při překřížení dvou čar



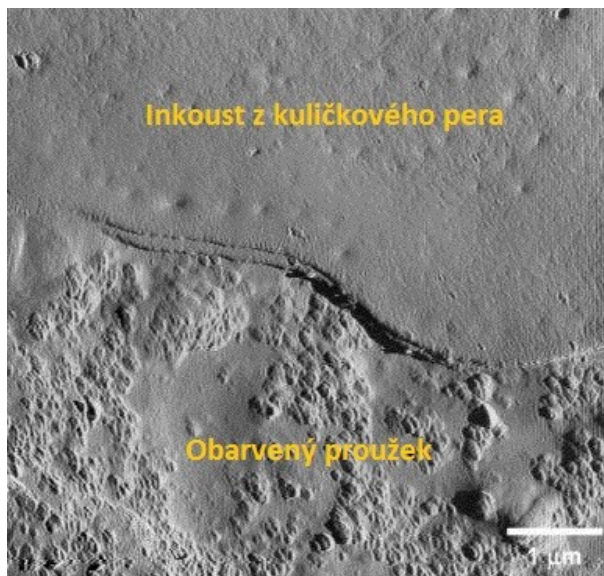
Obr. č. 42 – AFM zobrazení prázdného papíru na vzduchu

[19]



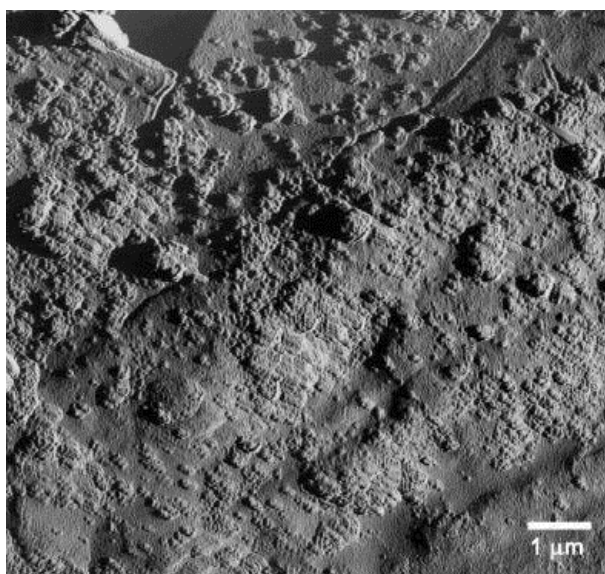
Obr. č. 43 – AFM zobrazení papíru popsaného kuličkovým perem

[19]



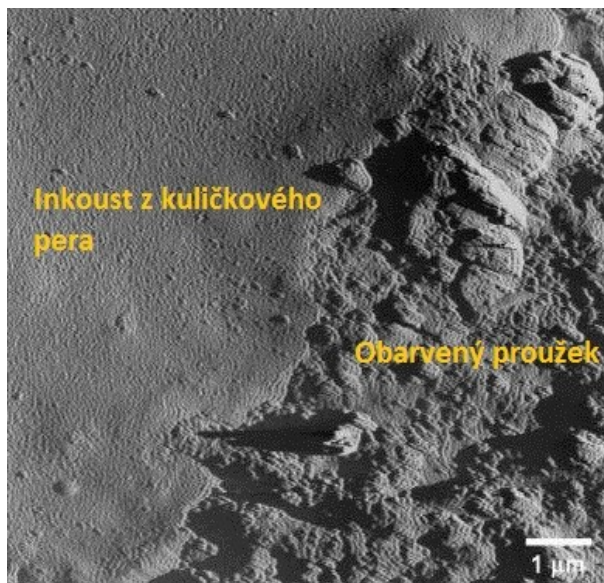
Obr. č. 44 – Zobrazení inkoustu, který leží v horní části nad obarveným pruhem

[19]



Obr. č. 45 – Obarvené pigmenty inkoustem – dopis byl vytisknut až po napsání

[19]



Obr. č. 46 – Obarvený pruh překrývá inkoust z kuličkového pera

[19]

4.2 Získání otisku prstu z nábojnice

Metoda získávání otisku prstů pomocí z nábojnice pomocí AFM je nejmodernější technika používaná forenzními specialisty, kteří jsou schopni obnovit otisk prstů z kovové nábojnice i poté, co byl otisk umyt. Využívá se mikroskopie atomárních sil pro vytvoření zobrazení otisku prstů. Pomáhá zjistit identitu osoby podílející se na trestném činu. Aby metoda byla efektivní, musí být specifické podmínky pro dotyk s nábojnicí (teplo a vlhko).

[18]

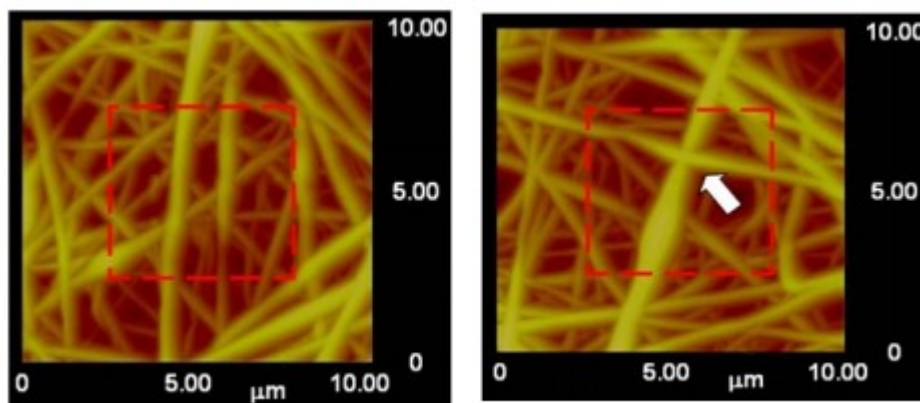


Obr. č. 47 - Otisk prstu na nábojnici

[16]

4.3 Porovnávání důkazních materiálů

V jedné studii byly zkoumány přírodní (vlna a bavlna) a celulózová textilní vlákna. Tyhle vlákna byly vystaveny různým zatížením po určitou dobu. Tyhle změny pak byly zkoumány pomocí AFM a uloženy do databáze. Pomocí těchto záznamů je možné porovnávat důkazní materiály a získat více informací. [20]



Obr. č. 48 – Zkoumání změn vláken (vlevo – před změnou, vpravo – po vystavení zátěže)

[20]

4.4 Určení stáří krve

Pomocí AFM lze určit stáří zaschlé krvavé skvrny. Kalibrační křivka pružnosti se v průběhu času vyvíjí. Pomocí této charakteristiky lze odhadnout stáří krevní skvrny. Výsledky zkoumání mohou pomoci v kriminalistice. [20]



Obr. č. 49 – Krevní skvrna

[21]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

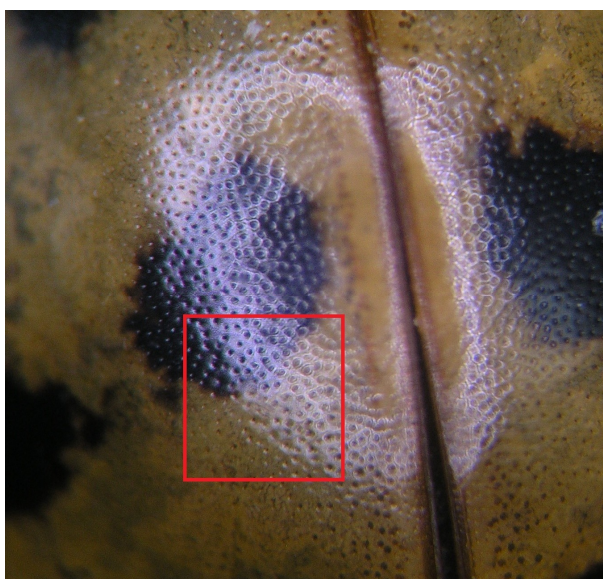
5 ZOBRAZENÍ BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ

5.1 Výběr biologického materiálu

Pro zobrazení biologických materiálů jsem zvolil následující vzorky: křídlo slunéčka sedmitečného, list pokojové rostliny a lidskou krev. Pro kontrolu jsem vzorky pozoroval pomocí optického mikroskopu (**Obr. Č. 50 a 52**), abych vybral místo pro skenování a vyvaroval se poškozeným místům.



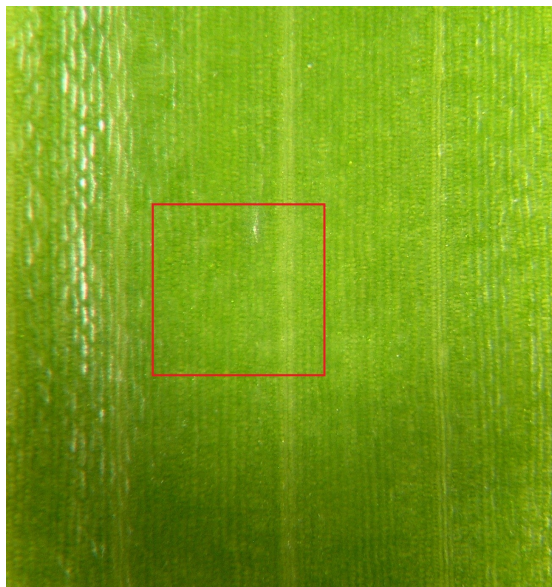
Obr. č. 50 - Slunéčko sedmitečné



Obr. č. 51 - Slunéčko sedmitečné - detail zvoleného místa pro skenování



Obr. č. 52 - List



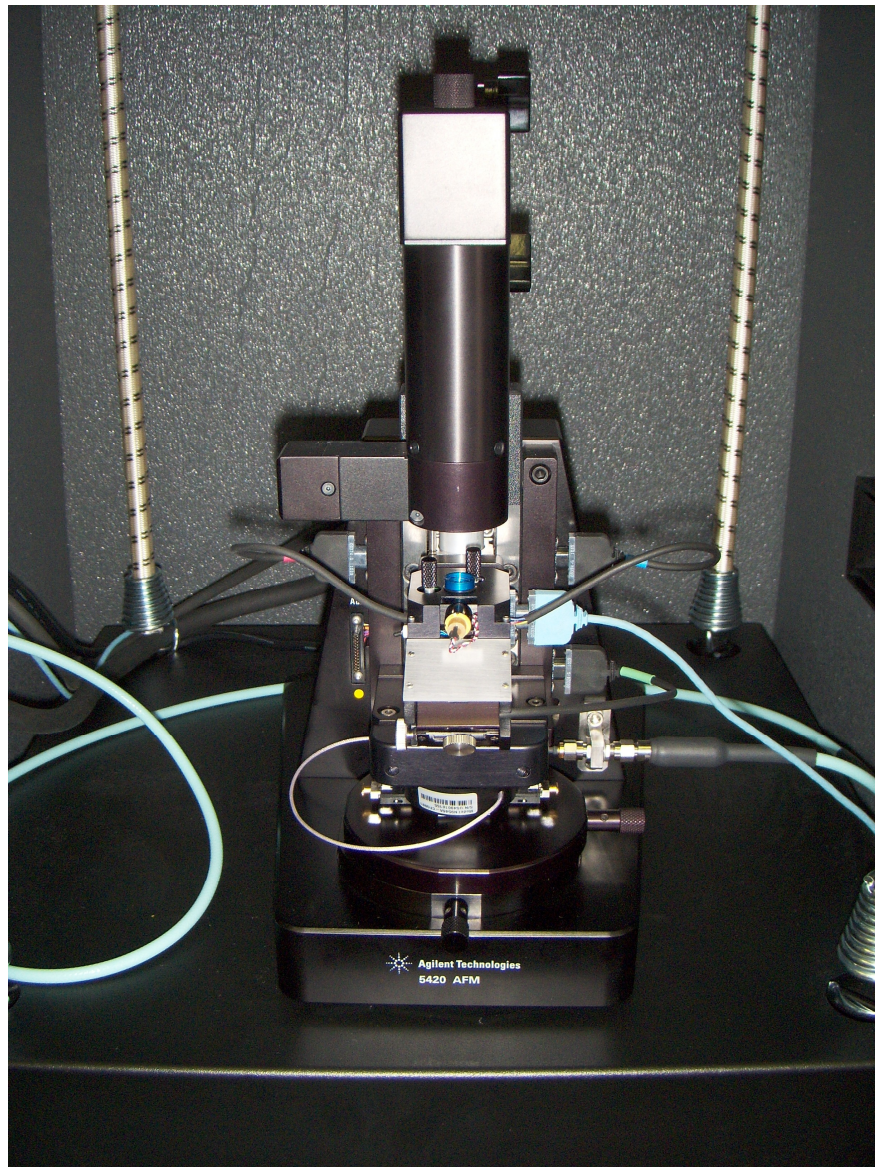
Obr. č. 53 - List - detail zvoleného místa pro skenování

5.2 Příprava vzorku

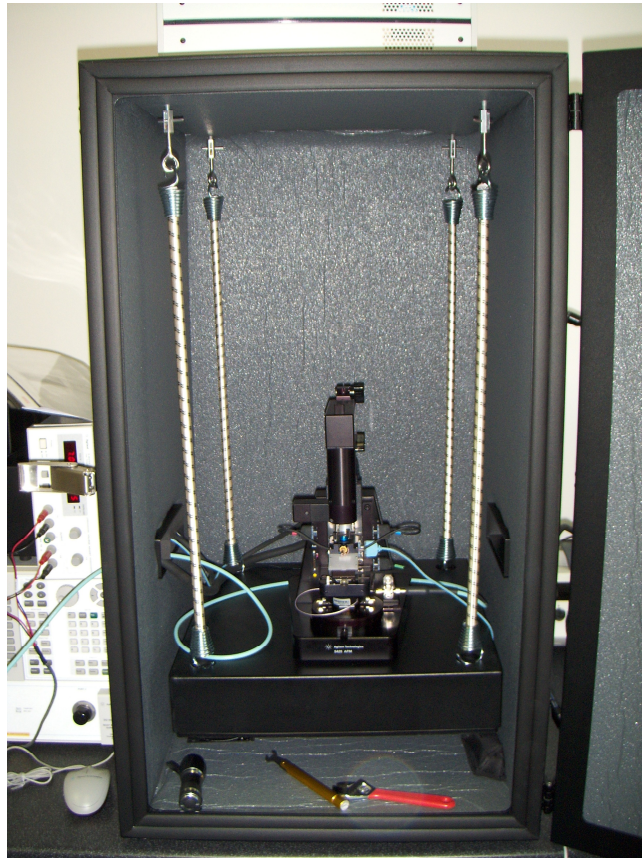
- Správně zvolit velikost vzorku, případně zmenšit odřezáním.
- Vzorek se pak upevní pomocí oboustranné lepicí pásky na měřicí sklíčko.
- Po předchozím pozorování optickým mikroskopem jsem zvolil místo skenování (Obr. č. 51 a 53).
- Vzorek je pak vhodné umístit do mikroskopu tak, aby hrot byl blízko zkoumaného místa. Urychlí se tak navedení hrotu k danému místu.

5.3 Měřicí aparatura

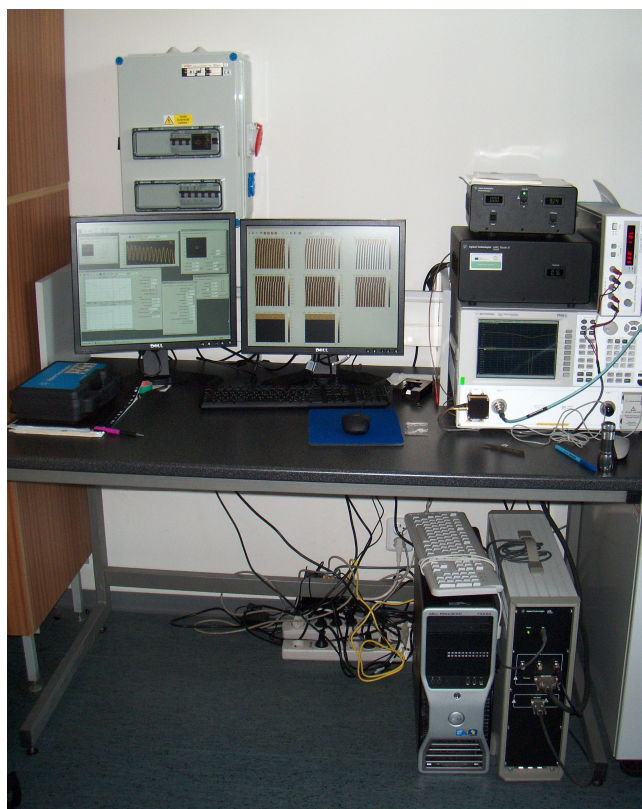
Měřicí pracoviště se skládá z několika základních součástí. Hlavním přístrojem je AFM mikroskop Agilent Technologies 5420 (**Obr. Č. 54**). Mikroskop je uchycen ve speciální skříni pro odstranění nežádoucích vnějších vlivů, jako jsou otřesy a průvan (**Obr. Č. 55**). Další elektronické součásti jsou napojeny na hlavní jednotku AFM mikroskopu, která je propojena s počítačem (**Obr. Č. 6**). Pomocí počítače, lze ovládat veškeré funkce mikroskopu. Na počítač jsou napojeny 2 monitory z důvodu přehlednějšího ovládání měřícího programu PicoView 1.2.



Obr. č. 54 - AFM mikroskop Agilent Technologies 5420



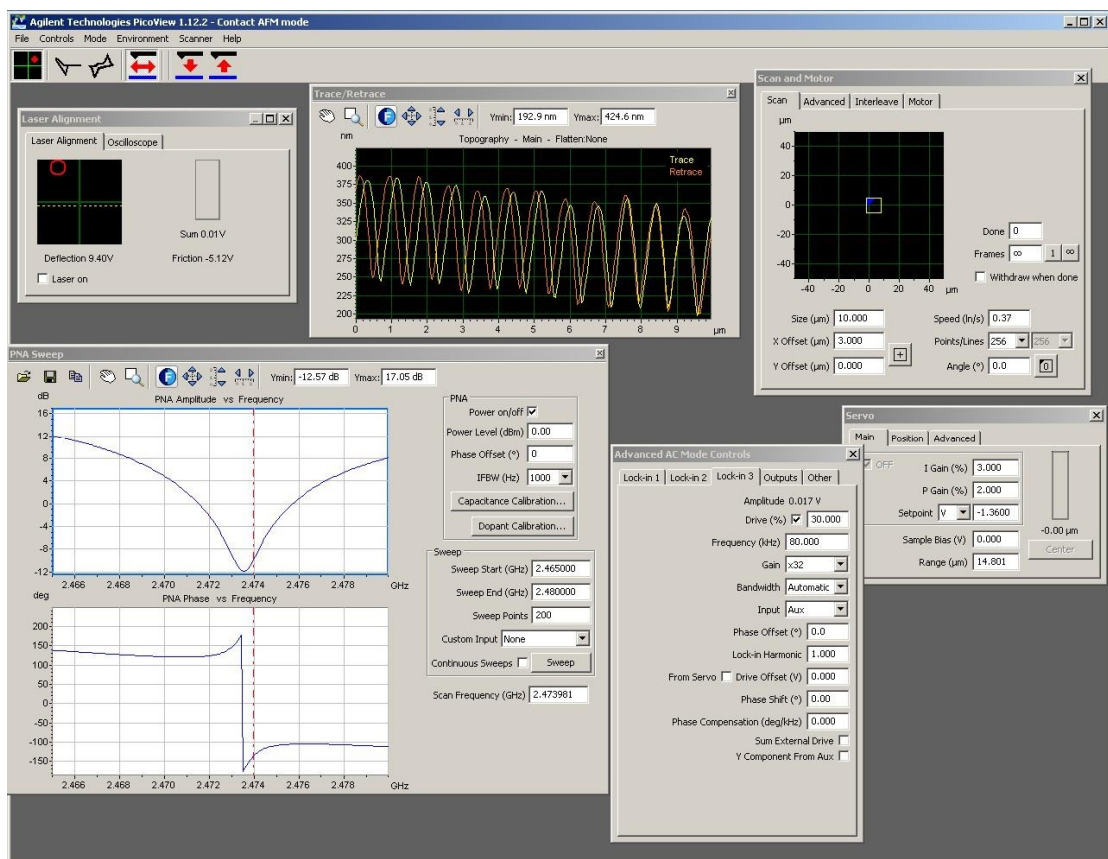
Obr. č. 55 - AFM mikroskop umístěn ve speciální skříní



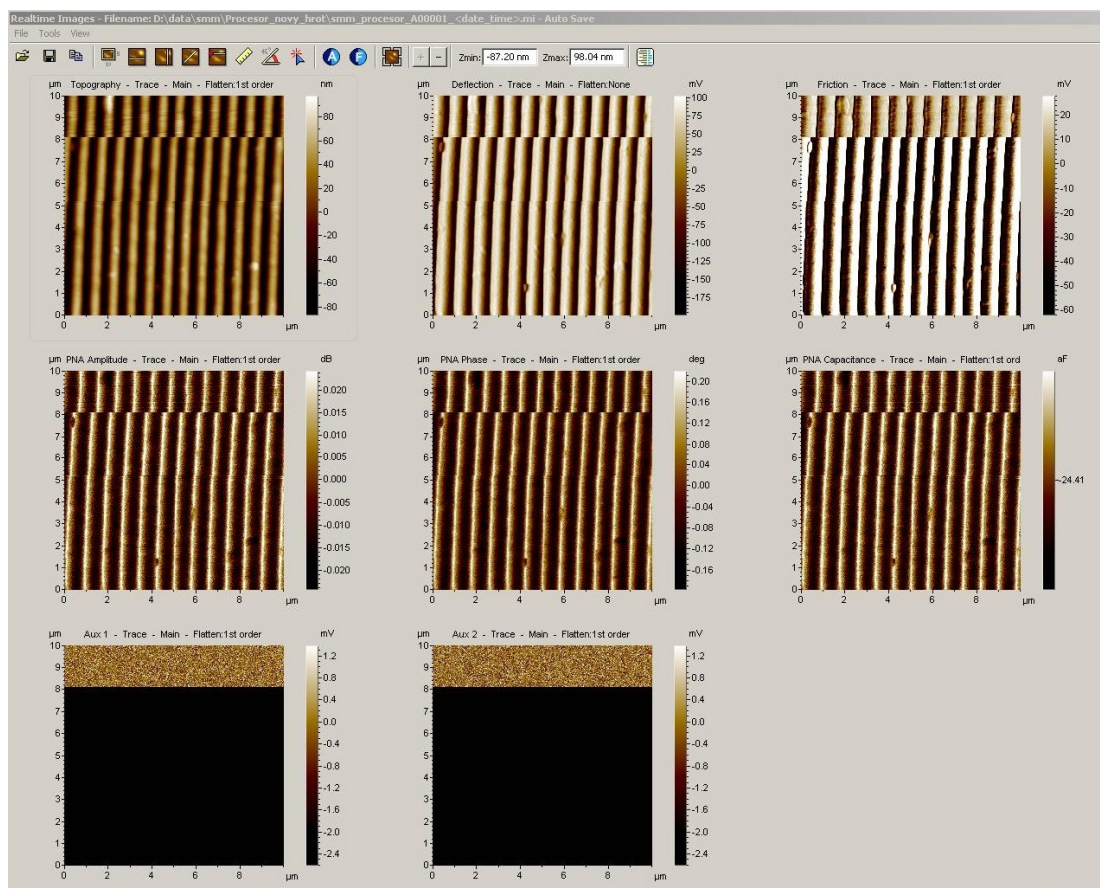
Obr. č. 56 - Měřicí pracoviště

5.4 Nastavení programu

Nastavení programu PicoView 1.2, který slouží pro skenování, by mělo odpovídat firemní literatuře Agilent Technologies. Pro ideální zobrazení rozhraní programu se využívají dva monitory. Na prvním monitoru je okno (**Obr. č. 57**), které slouží k veškerému nastavení skenování a ovládání hrotu. Na druhém monitoru je okno pro zobrazení v reálném čase (**Obr. č. 58**), na kterém jsou zobrazeny aktuální skenované obrazy ze všech měření, které probíhají simultánně.



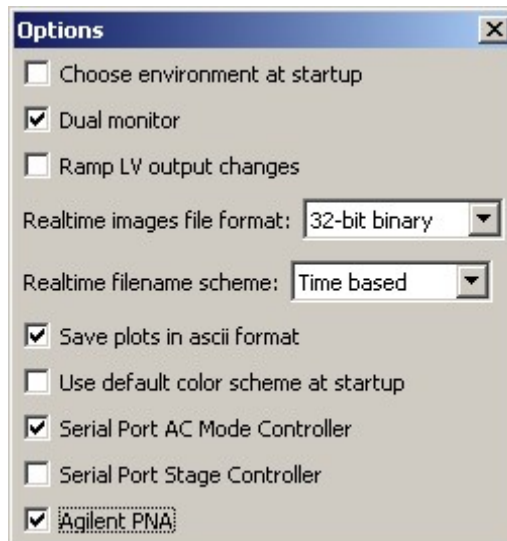
Obr. č. 57 – Okno sloužící k nastavení skenování



Obr. č. 58 – Okno pro zobrazování v reálném čase

5.4.1 Nastavení programu pro SMM skenování

- Spustíte program PicoView.
- Přejděte na **Controls > Setup > Options** a nastavte hodnoty dle **Obr. č. 59**.
- Nastavte **Image File Format** na 32 bit binární.
- Označte **Seriál Port AC Mode Controller**.
- Označte **Agilent PNA**.

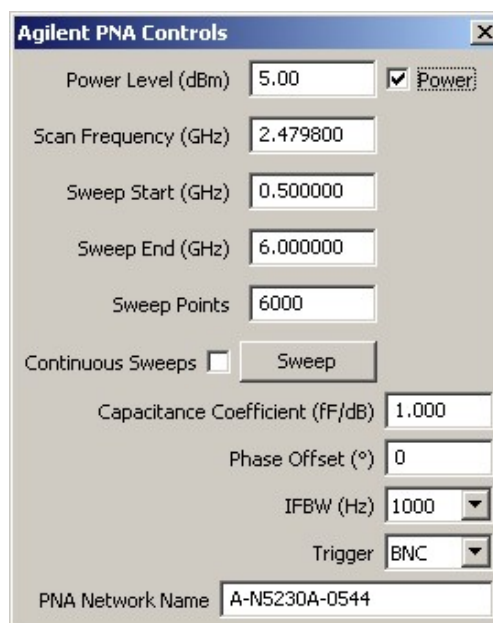


Obr. č. 59 – Doporučené nastavení

[22]

5.4.2 Nastavení frekvence mikrovlnného signálu

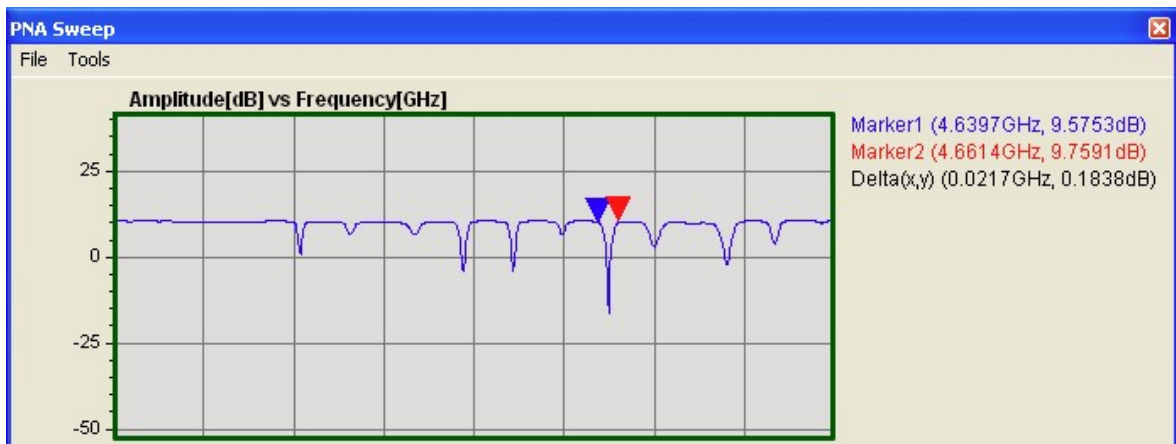
- V okně Agilent PNA Controls (Obr. Č. 60) nastavte **Sweep Start** na 0,5 GHz.
- Nastavte **Sweep End** na 6,0 GHz.
- Nastavte **Sweep Points** na 256.
- Klikněte na tlačítko **Sweep**.



Obr. č. 60 – Hodnoty pro nastavení okna Agilent PNA Controls

[22]

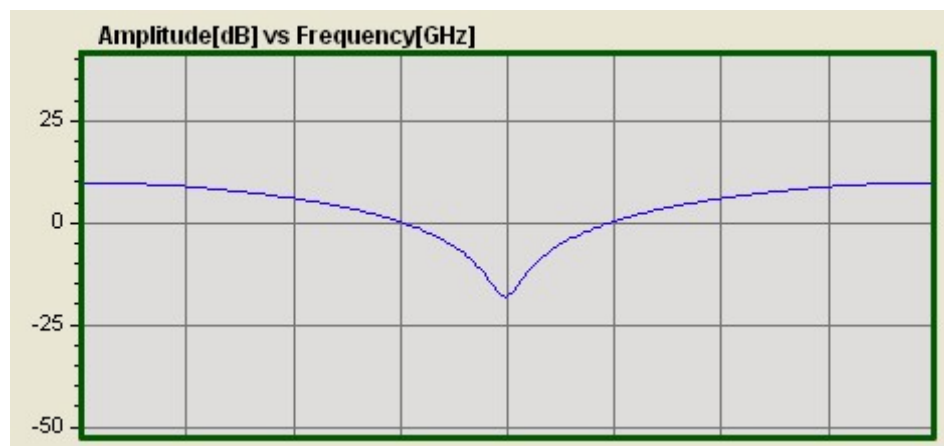
- Přejděte k oknu **PNA Sweep**.
- Přesuňte červené a modré značky jak je na **Obr. č. 61**.



Obr. č. 61 – Nastavení značek okna PNA Sweep

[22]

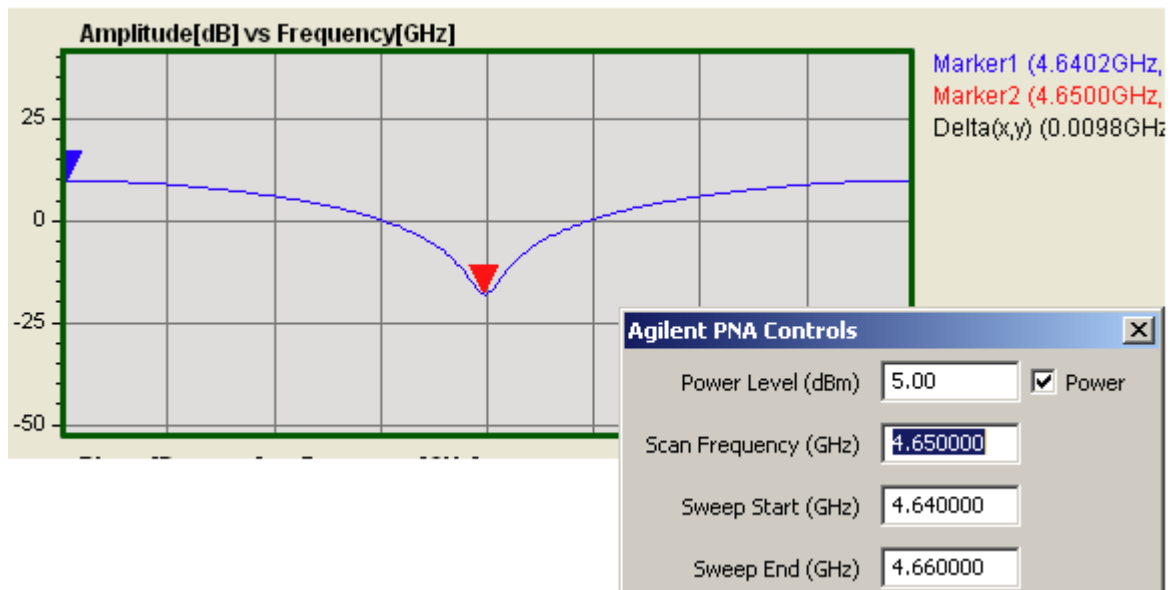
- Zobrazení Amplituda vs Frekvence by mělo být podobné jako na **Obr. č. 62**.



Obr. č. 62 – Zobrazení finálního vrcholku v grafu Amplituda vs Frekvence

[22]

- Použijte jeden z trojúhelníků na označení vrcholu frekvence, jak to můžete vidět na **Obr. Č. 63**.
- Nastavte hodnotu Scan Frequency (GHz) v okně Agilent PNA Controls.
- Mikroskop by pak měl být nastaven jako obvykle při kontaktním režimu.

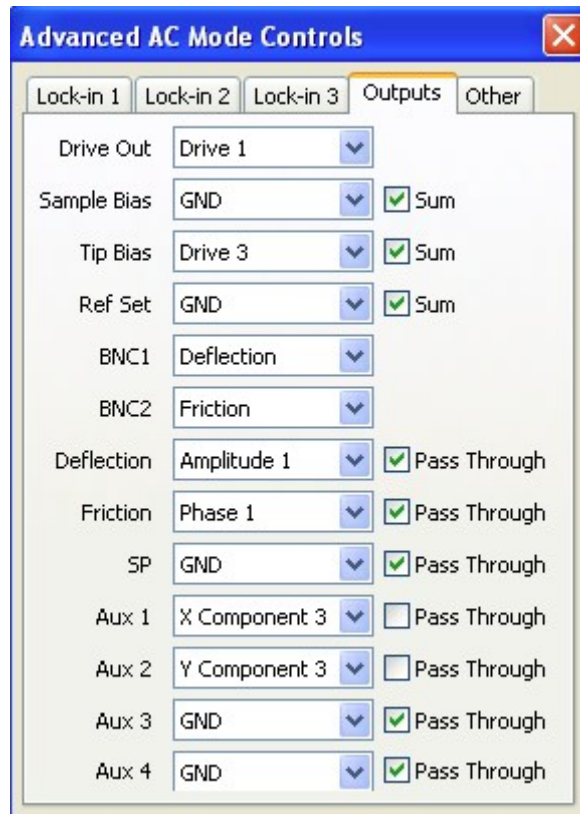


Obr. č. 63 – Zobrazení nastavení vrcholu frekvence a hodnoty pro nastavení okna Agilent PNA Controls

[22]

5.4.3 Nastavení dC/dV controler modulu

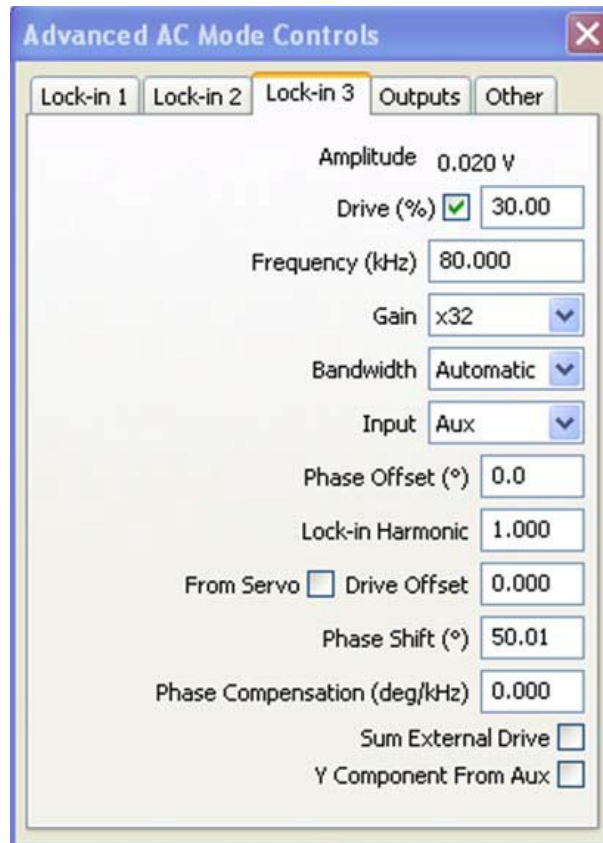
- Přejděte do **Controls > Advaced > AC Mode**.
- Nastavte hodnoty v okně dle **Obr. č. 64**.
- Vyberte **Output Tab**.
- Zvolte **Drive Out** – Drive1.
- Zvolte **Sample Bias** – GND.
- Zvolte **Tip Bias** – Drive 3.
- Zvolte **Ref Set** – GND.
- Zvolte **BNC1** – Deflection.
- Zvolte **BNC2** – Friction.
- Zvolte Deflection – Amplitude 1.
- Zvolte Friction – Phase 1.
- Zvolte SP – GND.
- Nastavte Aux 1 na X Component 3.
- Nastavte Aux 2 na Y Component 3.
- Odškrtněte Pass Through pro Aux 1 a Aux 2.
- Nastavte Aux 3 a Aux 4 na GND.



Obr. č. 64 – Hodnoty pro nastavení okna Advanced AC Mode Controls.

[22]


- Přepněte na kartu **Lock-In 3** v okně Advanced AC mode controls a nastavte hodnoty dle **Obr. č. 65**.
- Nastavte **Drive %** na 30 a zaškrtněte políčko.
- Nastavte **Frequency** na 80 kHz.
- Nastavte **Gain** na x32.
- Nastavte **Bandwidth** na Automatic.
- Nastavte **Input** na Aux.
- Nastavte **Phase Offset** na 0 °.
- Nastavte **Lock-in Harmonic** na 1.
- Nastavte **Phase Shift** na 0 °.
- **Drive Offset** a **Phase Compensation** nastavte na 0.
- Políčka u **Sum External Drive** a **Y Component from Aux** by měla být odškrtnuta.

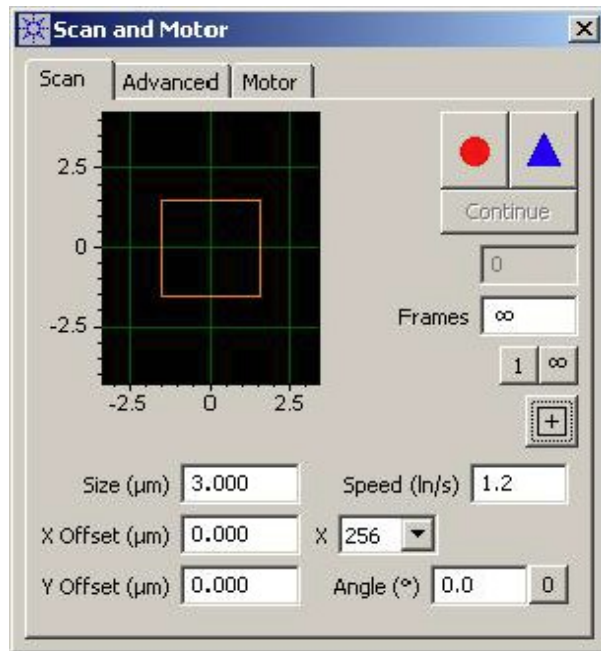


Obr. č. 65 – Hodnoty pro nastavení záložky Lock-in 3

[22]

5.4.4 Nastavení SMM kontaktního módu

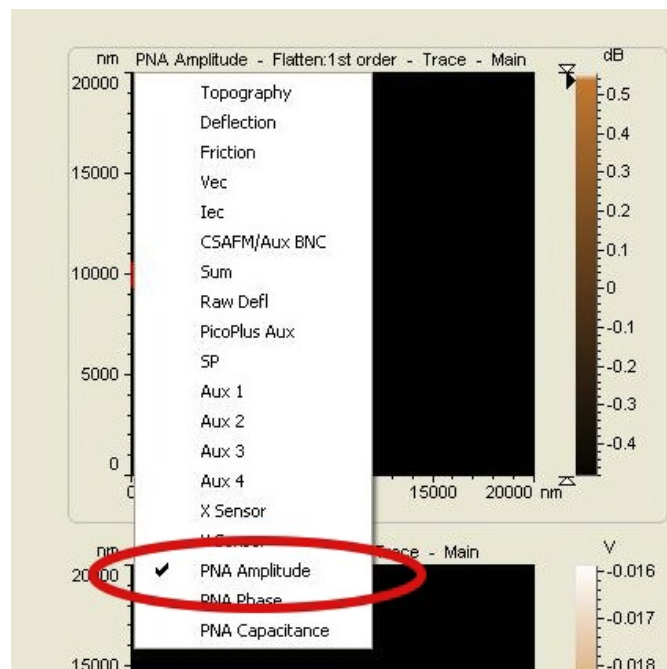
- Zaměřte laser na nosník.
- Vložte a zaměřte detektor.
- Připravte si vzorek a vložte ho do mikroskopu.
- Nastavte dC/dV pokud je to potřeba.
- Určete frekvenci mikrovlnného signálu.
- Zobrazte video okno a přibližte hrot těsně k vzorku.
- Vyberte zajímavou oblast pro skenování.
- Nastavte **Deflection** na -1,4 V.
- Nastavte **Setpoint** na 0 V.
- Klikněte na **Approach** tlačítko .
- V okně **Servo** se ujistěte, že jsou **I Gain** a **P Gain** nastaveny na 10%.
- Nastavte okno **Scan and Motor** podle Obr. č. 66.



Obr. č. 66 – Nastavení hodnot v okně Scan and Motor

[22]

- Nastavte rychlost skenování – **Speed**. Základní hodnoty jsou 1-2 ln/s.
- Přepnutím do Realtime Images můžete nastavit, která měření se budou zobrazovat.
- Klikněte na tlačítko „+“ pro přidání okna.
- Kliknutím pravým tlačítkem na okno můžete zvolit vstupní signál (Obr. č. 67)

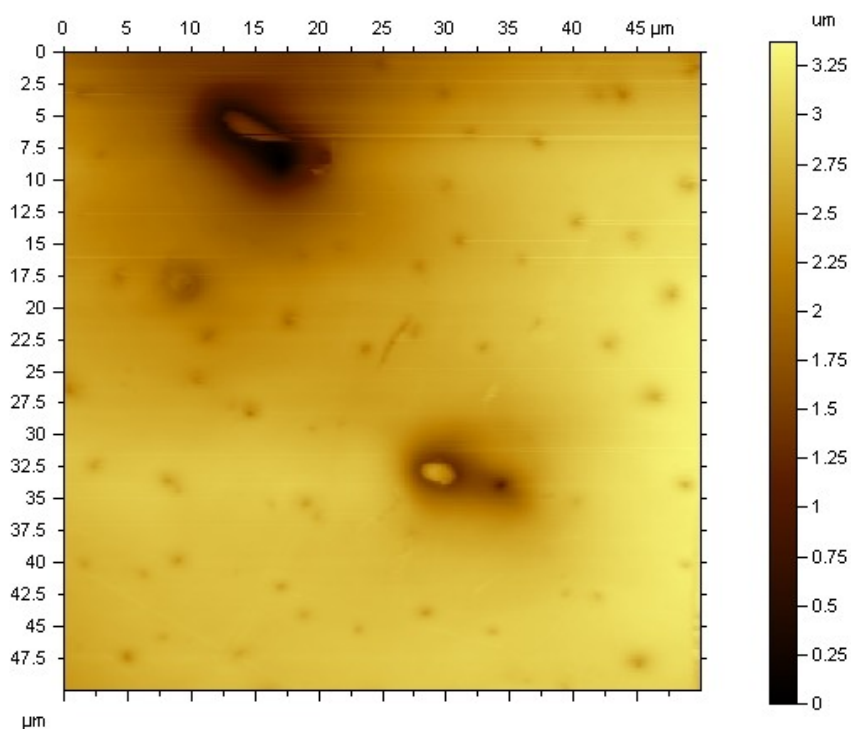


Obr. č. 67 – Zvolení vstupní signálu v okně Realtime Images

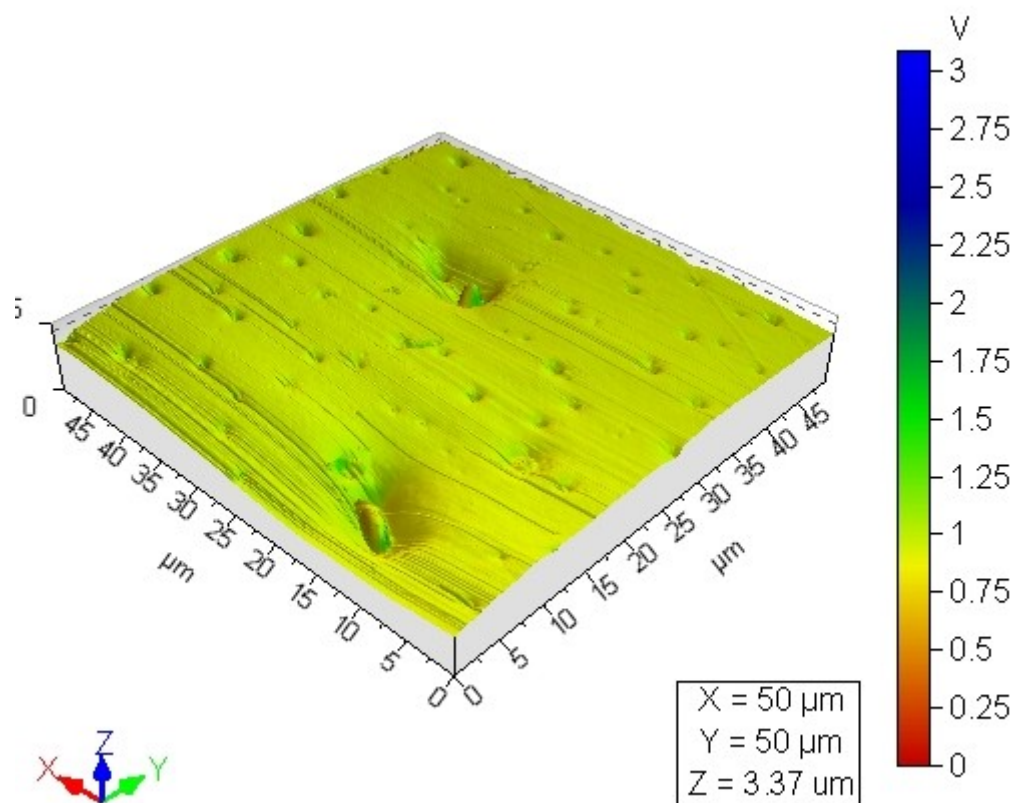
[22]

5.5 Výsledky měření

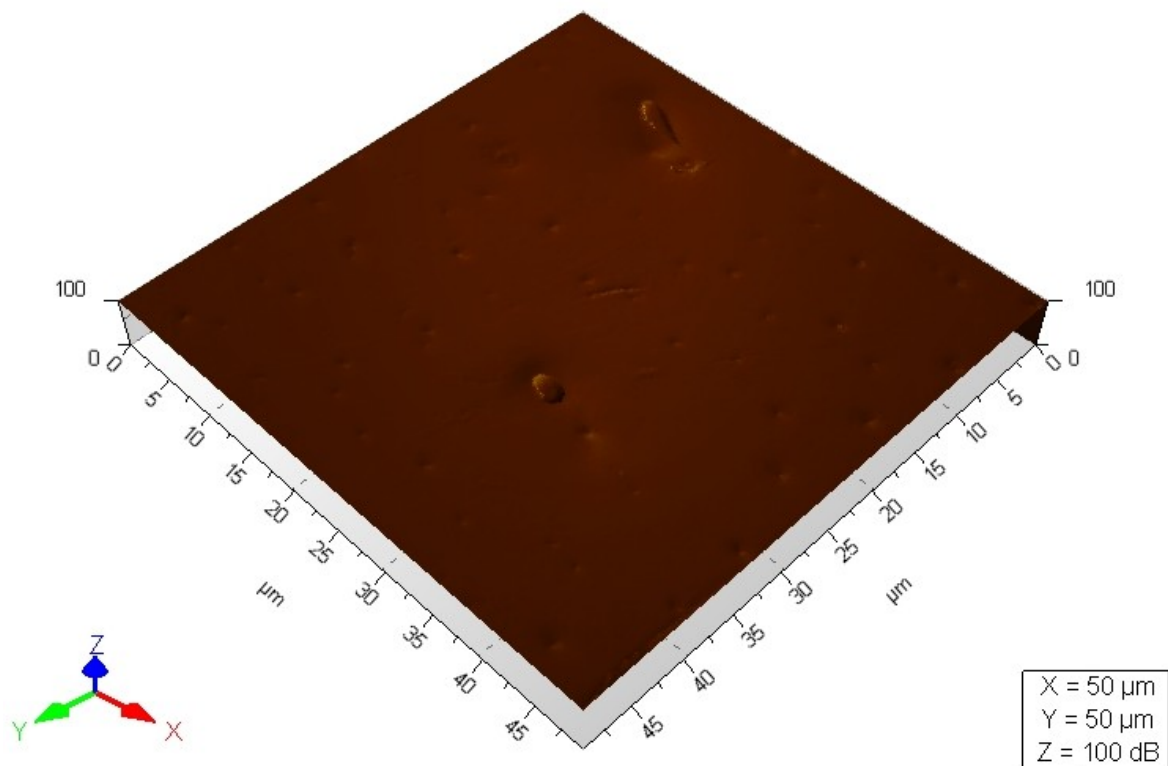
Prvním zobrazovaným biologickým materiálem je slunéčko sedmitečné, přesněji křídlo. Jelikož se měří simultánně topografie i SMM, můžeme výsledky mezi sebou porovnávat. U 3D zobrazení křídla slunéčka sedmitečného je tenhle rozdíl lehce viditelný (**Obr. č. 69 a 70**). Topografické zobrazení je mnohem detailnější. Další zajímavost, co lze pozorovat u **Obr. č. 69** je deformace biologického materiálu. Tohle poškození je způsobeno hrotem při skenování povrchu. To je jedna z nevýhod kontaktního režimu.



Obr. č. 68 - Zobrazení topografie křídla slunéčka sedmitečného

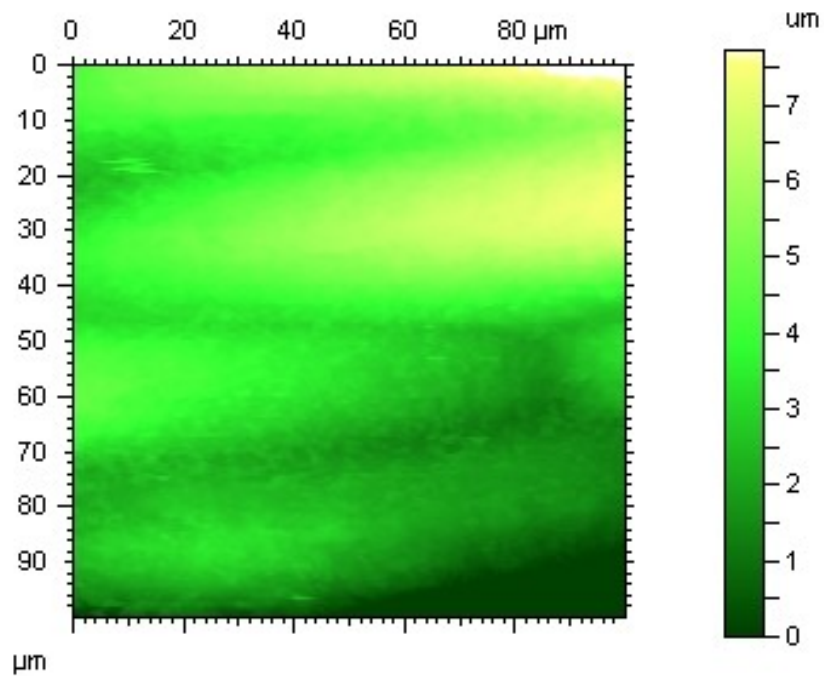


Obr. č. 69 - 3D zobrazení topografie křídla slunéčka sedmitečného

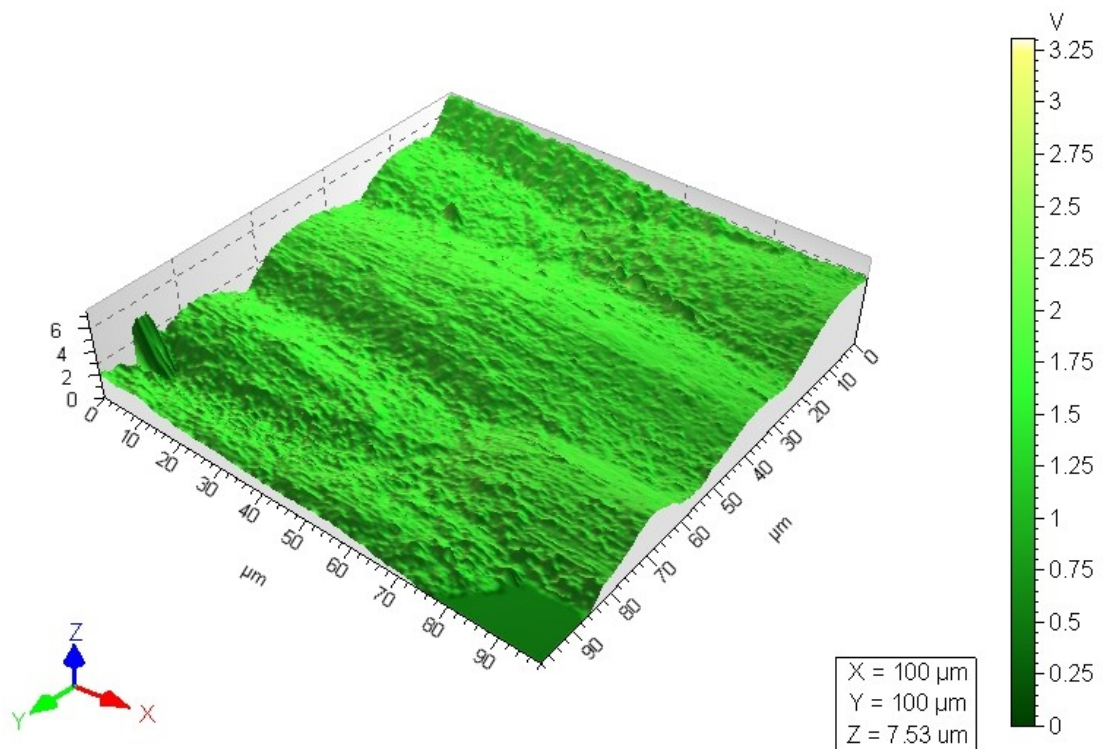


Obr. č. 70 - SMM zobrazení křídla slunéčka sedmitečného

Zobrazovaný list byl čerstvý a měl vyšší obsah vody. Z toho důvodu jsem zvolil zobrazení pomocí SMM módu, který krásně zachytil detailní povrch listu (**Obr. č. 72**).



Obr. č. 71 - SMM zobrazení listu



Obr. č. 72 - 3D zobrazení listu pomocí SMM

ZÁVĚR

Během studie principů mikroskopie atomárních sil, mi došlo, jak velký potenciál má tahle zobrazovací metoda. Uplatnění nachází ve všech vědních disciplínách. Nejen při zobrazování povrchů, ale i při tvorbě nových struktur – nanotechnologie.

V diplomové práci jsem se zaměřil na biologické materiály a jako vhodný objekt pro zobrazení pomocí mikroskopie atomárních sil jsem si zvolil list pokojové rostliny a křídlo sluněčka sedmítečného. Použil jsem mikroskop značky Agilent Technologies s označením 5420. Režim pro skenování vzorků jsem zvolil kontaktní v kombinaci s SMM módem. Měřil jsem ve vzduchu, tudíž nebylo potřeba nějak speciálně upravovat vzorek. Stačilo ho upevnit na sklíčko pomocí oboustranné lepící pásky a optickým mikroskopem zvolit vhodné místo skenování. Pomocí programu PicoView 1.2 jsem nastavil veškeré parametry skenování (přiblížení hrotu, rychlost řádkování, amplituda, frekvence atd.). Program pak zaznamenával povrch zkoumaného materiálu. Získané data jsem pak uložil a otevřel v programu Image Basic 6.2. Tento program poskytuje výkonné funkce pro vizualizaci povrchů, mnoho filtrů a dalších operátorů pro předzpracování a čišťení naměřených dat před analýzou, rozměrovou analýzu (vzdálenosti, výšky, hloubky, úhly plochy, objemy), spektrální analýzu a jejich shody s mezinárodními standardy. Program jsem použil pro plošné a 3D zobrazení naměřených vzorků (viz. obrázky v mé praktické části). Během měření jsem nenarazil na žádné větší potíže a oba biologické materiály se mi podařilo zobrazit. Hlavně v 3D zobrazení jde krásně vidět povrch zkoumaných vzorků.

Dále jsem se zabýval možnostmi aplikace AFM v bezpečnostní oblasti. Lze například využít při analýze dokumentů. Je možné zjistit překřížení čar nebo taky jestli byl první papír potisknut a pak podepsán nebo naopak. Další zajímavou aplikací je rekonstrukce otisku prstů na nábojnici, i když byl otisk smazán. Podle další studie lze zkoumat textilní vlákna a podle různých deformací lze určit, v jakých vnějších podmínkách se nacházela nebo jaké vnější síly na ně působily. Výsledky tohoto porovnávání lze využít při stopování majitel zkoumaného materiálu. Poslední aplikací, kterou jsem našel, je zkoumání staré krevní skvrny za účelem zjištění stáří skvrny. Pomocí této informace lze například zjistit čas spáchání trestného činu.

ZÁVĚR V ANGLIČTINĚ

Throughout study the principles of atomic force microscopy, I realized how much potential has this imaging method. It is applied in all scientific disciplines. Not only for imaging surfaces, but also to create new structures - nanotechnology.

In my dissertation thesis, I focused on biological materials and as suitable samples for view by atomic force microscopy, I have chosen: leaf house plants and wing ladybird. I used microscope brand Agilent Technologies marked 5420. Mode for scanning samples I have chosen contact mode in combination with SMM mode. I measured in the air, so wasn't need to modify the samples. Suffice to fix sample on glass slide using double sided sticky tape and by optical microscope select appropriate location for scanning. Using program PicoView 1.2 I have set all parameters of scanning (tip approaching, scan speed, amplitude, frequency, etc.). Program recorded surface investigated material. Obtained data I saved and opened in Pico Image Basic 6.2. Program provides powerful surface visualization features, many filters and other operators for pre-processing and cleaning up measurement data prior to analysis, dimension analyses (distances, heights/depths, angles, areas, volumes, and step heights), spectral analysis, and conformity to international standards. The program I used for flat and 3D view of measured samples (pictures in my practical part). During measurements, I don't run into any problems and I was able to view both biological materials. Especially in 3D view is nice to see surface of investigated samples.

Further I devoted possibilities of AFM applications in security area. It can for example use AFM to analyze documents. It is possible detect crossing lines or determine if it was first printed on paper and then signed or vice versa. Another interesting application is reconstruction of fingerprint on cartridge, although fingerprint was washed. According to another study can be examined textile fibers and by different deformations can be determined, in which external conditions located or what external forces acted on them. This information can help to find owner investigated object. The last application is examination old blood stain to determine age of stain. For example, using this information to determine time of the offense.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Studium biointerakcí pomocí AFM* [online]. Brno, 2009 [cit. 2012-05-04].
Dostupné z: <http://theses.cz/id/newrpe/>. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.
- [2] ALLISON, David. *The Evolution of Scanning Probe Microscopes for Biological Imaging* [online]. 2007, s. 12 [cit. 2012-05-04]. Dostupné z:
http://www.htest.cz/download/AFM_Evolution%20of%20SPM%20for%20biological%20imaging.pdf.
- [3] *Studium mechanických vlastností materiálů pomocí AFM* [online]. [cit. 2012-05-04]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/211152/prif_b/bc.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [4] HAN, Wenhai. *Introduction to Scanning Microwave Microscopy: Application Note* [online]. 2008, s. 4 [cit. 2012-05-04]. Dostupné z:
http://www.htest.cz/download/AFM_Introduction%20to%20SMM.pdf.
- [5] *AFM mikroskop* [online]. 2008, s. 6 [cit. 2012-05-05]. Dostupné z:
http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM_mikroskopie.pdf.
- [6] KHULBE, Kailash C. *Synthetic polymeric membranes*. Berlin: Springer, 2008. ISBN 978-3-540-73994-4.
- [7] *Mikromasch AFM tips and calibration gratings* [online]. Germany, 2010 [cit. 2012-05-05]. Dostupné z: <http://www.schaefer-tec.com/en/germany/products/scanning-probe-microscopy/mikromasch.html>.
- [8] NanoWorld. *AFM PROBES CATALOG* [online]. [cit. 2012-05-05]. Dostupné z:
<http://www.nanoworld.com/afm-probes-catalog>.
- [9] NT-MDT. *Noncontact/Semiconduct(NSG)* [online]. [cit. 2012-05-05]. Dostupné z:
<http://www.ntmdtips.com/usa/standard-afm-probes/non-contact-semi-contact-probes.html>.
- [10] MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT. *AFM/STM principle* [online]. [cit. 2012-05-05]. Dostupné z: http://www.mf.mpg.de/en/abteilungen/dosch/barrena/spm-principle_en.shtml.

- [11] AppNano. *Tapping / Non-Contact Mode* [online]. [cit. 2012-05-05].
<http://www.appnano.com/products/applications/tapping-non-contact-mode>.
- [12] Kubínek R., Vůjtek M., Mašláň M., *Mikroskopie skenující sondou*,
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Vydavatelství
Univerzity Palackého v Olomouci, 2003. IBSN 80-244-0602-0.
- [13] HTEST. *AFM imaging modes CZ* [online]. [cit. 2012-05-07]. Dostupné z:
http://www.htest.cz/download/AFM_AP_imaging%20modes_CZ.pdf.
- [14] Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. *Scanning tunneling microscopy* [online].
[cit. 2012-05-08]. <http://www.ieap.uni-kiel.de/surface/ag-kipp/stm/stm.htm>.
- [15] Micromeritics. *Dynamic Contact Electrostatic Force Microscopy with the XE-Series Atomic Force Microscope (AFM) from Park Systems* [online]. [cit. 2012-05-08]. <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2556>.
- [16] NT-MDT. *The preparing of the biological sample for Scanning Probe Microscopy: Influence of fixing methods on structural and morphological parameters of human blood cells* [online]. [cit. 2012-05-08].
http://www.rmi.cz/editor/image/analytika/pdf_cz_45.pdf.
- [17] SCIENCE INTERVIEWS. *Finding forgotten Fingerprints* [online]. [cit. 2012-05-10]. <http://www.thenakedscientists.com/HTML/content/interviews/interview/926/>.
- [18] eHow. *The Best Forensic Tools* [online]. [cit. 2012-05-10].
http://www.ehow.com/list_7292154_forensic-tools.html/.
- [19] ADYA, Ashok a Elisabetta CANETTA. *Applications of AFM for forensic investigations: Challenges, hopes, and limitations*. Forrest, 2008. University of Abertay Dundee.
- [20] FARRUKH, Muhammad Akhyar. *Nano-Forensics: Applications of Nanotechnology in Forensics* [online]. Lahore, 2011 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.chemistry2011.org/system/documents/274/original/Nano-Forensics.pdf?1333094269>. Department of Chemistry, GC University Lahore.

- [21] Crime Scene Forensics, LLC. *INTERPRETING BLOODSTAIN PATTERNS* [online]. [cit. 2012-05-10]. http://www.crimescene-forensics.com/Blood_Stains.html.
- [22] Agilent Technologies. *Agilent Technologies Scanning Microwave Microscopy Mode: User's Guide* [online]. 2009, s. 56 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: <http://www.home.agilent.com/>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAC	Acoustic AC.
AFM	Atomic Force Microscopy.
DFM	Dynamic Force Microscope.
DFS	Dynamic Force Spectroscopy.
DNA	Deoxyribonucleic Acid.
DRAM	Dynamic Random Access Memory.
EFM	Electric Force Microscopy.
GND	Ground.
KFM	Kelvin Force Microscope.
LFM	Lateral Force Microscopy.
MAC	Magnetic AC.
MFM	Magnetic Force Microscope.
MOSFET	Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor.
MRFM	Magnetic Resonance Force Microscopy
PEG	Polyethylene Glycol
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
PNA	Phase Noise Analysis
PTZ	Pan Tilt Zoom.
RNA	Ribonucleic Acid.
SCAFM	Current Sensing AFM
SCM	Scanning Capacitance Microscopy
SMM	Scanning Microwave Microscopy.
SNOM	Near-Field Optical Microscopy
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

- SPM Scanning Probe Microscopy.
- SRAM Static Random Access Memory.
- SSRM Scanning Spreadind Resistance Microscopy.
- STM Scanning Tunneling Microscope.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1 – G. Binning	Obr. č. 2 - H. Rohrer	12
Obr. č. 3 - S-vrstvý protein izolovaný z bakterie zobrazený ve vysokém rozlišení pomocí MAC módu v kapalině.		18
Obr. č. 4 - Zobrazení živé bakterie <i>Rhodospseudomonas palustris</i> , která je znehybněná na želatinou pokryté slídové podložce a uložené v kapalině.		18
Obr. č. 5 - AFM zobrazení myšího kosmidu ve vzduchu. Tmavé místa na DNA ukazují individuální EcoRI endonukleozové molekuly, které se vážou na DNA molekuly specifickým způsobem. To dokládá užitečnost AFM ke studiu DNA a mapování DNA sekvencí se specifickými proteiny za běžných podmínek.		20
Obr. č. 6 - Zobrazení chromatinu pomocí MAC módu. Tyto proteiny, zvané nukleozomy, jsou součástí DNA.		20
Obr. č. 7 - Vlevo: AFM zobrazení titin molekule. Vpravo: Křivka síla-vzdálenost vyplývající z praskání jednotlivých částí jedno-molekulového titinu. Molekula titinu byla upevněna k pevnému povrchu a pak prodlužována pomocí AFM hrotu, který se vzdaloval od povrchu. Každé maximum odpovídá síle potřebné k prasknutí individuální oblasti. Vzdálenost mezi vrcholy křivky odpovídá délce každé oblasti.		21
Obr. č. 8 - Vlevo: Zobrazení avidinu na slídovém povrchu pomocí MAC módu. Vpravo: Zkoumáním povrchu, pokrytém avidinem pomocí AFM hrotu na kterém je molekula biotinu, vznikla křivka síla-vzdálenost pro interakci biotin-avidin. Modrá čára zobrazuje chování AFM hrotu vůči povrchu s avidinem. Červená čára představuje oddalování biotinylovaného hrotu od povrchu. Na křivce je vrchol, který představuje nespecifikovatelnou adhezi mezi AFM hrotem a avidinem pokrytým povrchem (a). Navíc je zde zobrazen vrchol, který odpovídá síle potřebné k uvolňující události mezi biotinem a avidinem (b).		22
Obr. č. 9 - MAC mód topografie (vlevo) a simultánní zobrazení molekulárního rozpoznávání (vpravo) avidinu a interakce biotin-avidin pomocí PicoTREC a Agilnet 5500 AFM/SPM. Na slídový povrch byly upevněny molekuly avidinu a pak byly skenovány AFM hrotem modifikovaným		

biotinem. Na výsledném zobrazení topografie jsou vidět bílé oblasti, které představují molekuly avidinu. Tmavé oblasti odpovídají molekulárním interakcím mezi biotinem a avidinem. Tyto interakce jsou ve stejných místech, jako jsou viděny u topografie.	24
Obr. č. 10 - Schéma AFM mikroskopu	27
Obr. č. 11 - Hrot a nosník.....	28
Obr. č. 12 - AFM hroty (A – šípový hrot pro poklepový režim, B – hrot pro kontaktní režim, C – pyramidový hrot)	29
Obr. č. 13 - Síly působící mezi hrotem a vzorkem	32
Obr. č. 14 - Kontaktní režim ($D \sim F \sim \Delta h$, kde Δh = vertikální pohyb hrotu, F = interakční síla, D = deflektace nosníku).....	33
Obr. č. 15 - Poklepový režim.....	35
Obr. č. 16 - F-d křivka – vzorek ve vakuu	36
Obr. č. 17 - F-d křivka – vzorek ve vzduchu	37
Obr. č. 18 - F-d křivka – kontaminovaný povrch	37
Obr. č. 19 - Propojení AFM se síťovým analyzátozem.....	39
Obr. č. 20 - Optická analogie mikrovlnné analýzy	41
Obr. č. 21 - Simultánní zobrazení topografie (A), kapacity (B) a dC/dV SRAM čipu. Střídající se <i>p</i> a <i>n well</i> jsou jasně identifikovatelné v obou zobrazeních – kapacitní a dC/dV . Pět ze šesti tranzistorů jsou vyznačeny v B a C.	42
Obr. č. 22 - Topografie (A a C) a dC/dV (B a D) zobrazení SRAM. C a D jsou přibližné skeny tranzistorů modře označených čtverečků v A/B.....	42
Obr. č. 23 - Simultánní zobrazení topografie (A), kapacity (B) a dC/dV (C) pomocí SiGe zařízení. Kapacitní a dC/dV zobrazení umožňuje vidět struktury dopantů, které nelze vidět pomocí topografie.	43
Obr. č. 24 - Zobrazení topografie (A) a odpovídající impedance (B) vysušené buňky bakterie <i>Sulfurreducens</i> na zlatém povrchu.	44
Obr. č. 25 - MAC režim	45
Obr. č. 26 - Akustický AC režim: a) snímač uchycený k uložení nosníku se užívá k vybuzení nosníku k oscilaci; b) amplituda oscilace, když je hrot daleko od povrchu; c) redukovaná amplituda, když se hrot přiblíží k povrchu	47
Obr. č. 27 - Princip snímání proudu	47

Obr. č. 28 - Princip modulace síly	48
Obr. č. 29 - Změny fáze	49
Obr. č. 30 – Znázornění pulsující síly	50
Obr. č. 31 - Princip EFM.....	51
Obr. č. 32 - Princip MFM.....	52
Obr. č. 33 – Znázornění mikroskopie bočních sil	53
Obr. č. 34 - Princip STM.....	54
Obr. č. 35 - Zrcadlení pyramidového hrotu	56
Obr. č. 36 - Ukázka zobrazení při nesymetrii hrotu.....	57
Obr. č. 37 - Proužky způsobené světelnou interferencí.....	58
Obr. č. 38 - Žijící polymorfonukleární neutrofilů a profil živých buněk v tekutině získané pokleповým režimem kontaktní Si sondou - CSG11. Rychlost snímání 2 řádky/sec.....	60
Obr. č. 39 - Žijící polymorfonukleární neutrofilů a profil živých buněk v tekutině získané pokleповým režimem kontaktní Si sondou - CSG11. Rychlost snímání 2 řádky/sec.....	61
Obr. č. 40 – Zobrazení polymorfonukleární neutrofilů uchycené v methanolu zkoumané ve vzduchu kontaktním režimem Si sondou CSG11. Rychlost snímání 1 řádky/sec.....	62
Obr. č. 41 - Zobrazení polymorfonukleární neutrofilů uchycené v glutaraldehydu zkoumané ve vzduchu kontaktním režimem Si sondou CSG11. Rychlost snímání 0,5 řádky/sec.....	62
Obr. č. 42 – AFM zobrazení prázdného papíru na vzduchu	64
Obr. č. 43 – AFM zobrazení papíru popsaného kuličkovým perem	64
Obr. č. 44 – Zobrazení inkoustu, který leží v horní části nad obarveným pruhem.....	65
Obr. č. 45 – Obarvené pigmenty inkoustem – dopis byl vytisknut až po napsání	65
Obr. č. 46 – Obarvený pruh překrývá inkoust z kuličkového pera	66
Obr. č. 47 - Otisk prstu na nábojnici	66
Obr. č. 48 – Zkoumání změn vláken (vlevo – před změnou, vpravo – po vystavení zátěže)	67
Obr. č. 49 – Krevní skvrna.....	67
Obr. č. 50 - Slunéčko sedmitečné.....	69
Obr. č. 51 - Slunéčko sedmitečné - detail zvoleného místa pro skenování.....	69

Obr. č. 52 - List.....	70
Obr. č. 53 - List - detail zvoleného místa pro skenování	70
Obr. č. 54 - AFM mikroskop Agilent Technologies 5420	71
Obr. č. 55 - AFM mikroskop umístěn ve speciální skříni.....	72
Obr. č. 56 - Měřicí pracoviště	72
Obr. č. 57 – Okno sloužící k nastavení skenování.....	73
Obr. č. 58 – Okno pro zobrazování v reálném čase	74
Obr. č. 59 – Doporučené nastavení.....	75
Obr. č. 60 – Hodnoty pro nastavení okna Agilent PNA Controls	75
Obr. č. 61 – Nastavení značek okna PNA Sweep	76
Obr. č. 62 – Zobrazení finálního vrcholku v grafu Amplituda vs Frekvence	76
Obr. č. 63 – Zobrazení nastavení vrcholu frekvence a hodnoty pro nastavení okna Agilent PNA Controls	77
Obr. č. 64 – Hodnoty pro nastavení okna Advanced AC Mode Controls.	78
Obr. č. 65 – Hodnoty pro nastavení záložky Lock-in 3	79
Obr. č. 66 – Nastavení hodnot v okně Scan and Motor.....	80
Obr. č. 67 – Zvolení vstupní signálu v okně Realtime Images	80
Obr. č. 68 - Zobrazení topografie křídla sluněčka sedmítečného.....	81
Obr. č. 69 - 3D zobrazení topografie křídla sluněčka sedmítečného.....	82
Obr. č. 70 - SMM zobrazení křídla sluněčka sedmítečného	82
Obr. č. 71 - SMM zobrazení listu	83
Obr. č. 72 - 3D zobrazení listu pomocí SMM	83

SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1 – Morfologické parametry polymorfonukleárních neutrofilů	63
---	-----------