МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА, ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Галлямов Марат Олегович

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ТОНКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ПЛЕНОК

Специальность 01.04.07 — «Физика твердого тела»

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научные руководители:
доктор физико-математических наук,
профессор Потемкин В.В.
доктор физико-математических наук
Яминский И.В.

Москва — 1999 г.

Оглавление

Список иллюстраций

Список таблиц

Список используемых сокращений

АСМ — Атомно-силовая микроскопия

БСА — Бычий сывороточный альбумин

ВТМ — Вирус табачной мозаики

ВЭМК — Вирус энцефаломиокардита (мышей)

ГО — Горизонтального осаждения (метод)

ДМСО — Диметилсульфоксид

ДНК — Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСДАХ — Дистеарилдиметиламмоний хлорид

ИК — Инфракрасная (спектроскопия)

ЛБ — Ленгмюра-Блоджетт (метод или покрытие)

ПАВ — Поверхностно-активные вещества

ПО — Программное обеспечение

РНК — Рибонуклеиновая кислота

СЗМ — Сканирующая зондовая микроскопия

СТМ — Сканирующая туннельная микроскопия

УФ — Ультрафиолетовая (спектроскопия)

ФМ — Флуоресцентная микроскопия

ХАС — Хлороформ: ацетон: спирт (раствор)

ЦП — Центрированная прямоугольная (ячейка)

ЦТАБ — Цетилтриметиламмоний бромид

ЭМ — Электронная микроскопия

абс. ед. — абсолютные единицы

отн. ед. — относительные единицы

пирографит — высокоориентированный пиролитический графит

п.о. — пары оснований

х. ч. — химически чистое (вещество)

BAC — Бензилдиметилалкиламмоний хлорид

APTES — Аминопропилтриэтоксисилан

Введение

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ), объединяющая широкий спектр современных методов исследования *поверхности*, насчитывает полтора десятка лет своей истории — с момента создания в 1981 г. Биннигом и Рорером сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) [1, 2]. За прошедшие годы применение зондовой микроскопии позволило достичь уникальных научных результатов в различных областях физики, химии и биологии. Наиболее яркими демонстрациями возможностей этого экспериментального направления при исследовании поверхностей твердых тел могут служить: результаты по прямой визуализации реконструкции поверхностей [3][1)], манипуляция отдельными атомами для записи информации с рекордной плотностью, исследование локального влияния поверхностных дефектов на зонную структуру образца [4] и пр.

Новые экспериментальные возможности рассматриваемого направления в сравнении с традиционными методами исследования поверхности делают особенно перспективным применение зондовой микроскопии (в частности атомно-силовой микроскопии (АСМ) [5]) для изучения *биологических и органических* материалов. На этом пути в последние годы также был достигнут значительный прогресс. В частности, применительно к исследованиям нуклеиновых кислот, можно упомянуть о таких результатах, как визуализация отдельных молекул ДНК [6] и исследование их конформационного состояния в жидких средах, прямое измерение сил взаимодействия комплементарных нуклеотидов [7], визуализация в реальном масштабе времени процессов взаимодействия ДНК с белками [8].

В то же время зондовая микроскопия биологических и органических объектов и структур остается более сложной задачей в сравнении с СЗМ-анализом поверхностей твердых тел. Действительно, прошло более

[1)] например, поверхности Si (111) 7×7

десяти лет с момента возникновения СЗМ, прежде чем была убедительно показана ее адекватность для исследований биообъектов (в 1992 г. на примере молекулы ДНК [6]). Это связано с такими особенностями подобных объектов, как низкая проводимость[2)] и невысокая механическая жесткость. Актуальной является проблема иммобилизации данных структур на поверхностях твердых подложек в процессах приготовления образцов и при исследованиях (особенно в жидких средах). Важно, чтобы объекты были зафиксированы на подложке в таком состоянии, чтобы было возможно исследовать их интересующие структурные особенности. Возможным подходом к решению этой задачи может служить, например, модификация свойств подложки путем контролируемого осаждения на ее поверхность тонких органических пленок с заданными свойствами.

Весьма важным для адекватного применения зондовых микроскопов в широкомасштабных научных исследованиях является отслеживание и систематизация возможных механизмов возникновения *артефактов*, т.е. аппаратных эффектов, приводящих к наблюдению ложных или искаженных свойств исследуемого объекта, которое может быть обусловлено, например, воздействием на объект самого инструмента исследования и пр.

Действительно, сканирующий зондовый микроскоп представляет собой «проектор», проецирующий объекты и явления микромира на доступный нашему восприятию «экран» — в силу многих причин удобно, чтобы им служил экран монитора компьютера. В этом случае проекция становиться отчасти «осязаемой», поскольку допускает возможность дополнительного анализа с помощью соответствующего программного обеспечения. Однако подобное «проецирование» несет только частичную информацию об объекте, к тому же отчасти искаженную влиянием самого «проектора». Восстановление по проекции реальных свойств исследуемых объектов является типичной обратной задачей, требующей решения и для зондовой микроскопии.

[2)] важно при СТМ-исследованиях

Цель и задачи исследования

Целью работы являлась разработка методов исследования нуклеиновых кислот и их комплексов с помощью зондовой микроскопии.

В этой связи основными задачами настоящей работы являлись:

- разработка методов определения истинной геометрии объектов путем анализа экспериментально измеренных параметров их АСМ-изображений (учет артефактов);
- определение адекватных методик иммобилизации молекул нуклеиновых кислот и их комплексов с белками и поверхностно-активными веществами в различных экспериментальных условиях (при проведении исследовании в жидких средах или на воздухе) на различных подложках;
- отработка подходов к решению задачи модификации свойств подложки путем контролируемого осаждения тонких органических пленок; исследование влияния на качество (однородность, бездефектность) и структуру сформированного покрытия специфики процедуры его формирования и природы подложки.

При решении основных задач возникла необходимость или возможность рассмотрения ряда дополнительных и вспомогательных вопросов и проблем. Так, анализируя проблему определения истинной геометрии объекта по результатам исследования АСМ (глава 2), рассмотрели два основных артефакта, проявляющихся при исследовании микрообъектов, адсорбированных на поверхность твердой подложки: эффект уширения (раздел 2.2) и эффект занижения высот АСМ-профиля (раздел 2.1). При разработке методики количественного описания эффекта занижения высот привлекли теорию контактных деформаций; следствия ее применения для анализа результатов АСМ потребовали (этому посвящен раздел 2.1.5) объяснить с позиций контактной теории механизм АСМ-визуализации атомной или молекулярной структур поверхности.

Определение адекватной методики иммобилизации одноцепочечной вирусной РНК (глава 3) на поверхности подложки позволило визуализировать стадии процесса последовательного разрушения вирусной частицы с высвобождением молекулы РНК, находящейся в белковой оболочке (раздел 3.1.1), и проанализировать неэквивалентность протекания этого процесса для двух концов вирусной частицы (раздел 3.1.2).

Разработка методов определения истинной геометрии объектов позволила, при проведении исследований компактизации[3)] молекул ДНК (глава 4), проанализировать количественный молекулярный состав компактизованных структур. Отработка методики исследования нуклеиновых кислот в жидких средах (описана в разделе 4.2.2) позволила изучить промежуточные стадии процесса компактизации ДНК непосредственно в жидкостной ячейке АСМ и определить структуру конденсированной молекулы.

При исследовании тонких пленок (см. главу 5), применение метода формирования искусственных дефектов (см. рис. 5.10) дало возможность проанализировать углы взаимоориентации осей решетки пленки и подложки. Кроме того, для ряда тонкопленочных покрытий удалось осуществить АСМ-визуализацию молекулярной упаковки и определить параметры элементарной ячейки. Это позволило сделать выводы о природе механизмов, определяющих молекулярную структуру пленок.

[3)] переход «клубок» $\to$ «глобула»

Глава 1

Основные принципы сканирующей зондовой микроскопии

Общей чертой всех сканирующих зондовых микроскопов (и определяющей их название) является наличие микроскопического *зонда*, который приводится в *контакт*[1] с исследуемой поверхностью и перемещается по некоторому заданному участку поверхности, осуществляя его зондирование (или *сканирование*).

Контакт зонда и образца подразумевает их взаимодействие. Строго говоря, в общем случае это взаимодействие носит сложный характер. Чтобы осуществлять исследование с помощью конкретного прибора, из широкого спектра выбирается какое-либо одно рабочее взаимодействие. Природа этого выбранного взаимодействия и определяет принадлежность прибора к тому или иному типу в рамках семейства зондовых микроскопов. Информация о поверхности извлекается путем фиксации[2] или детектирования взаимодействия зонда и образца.

В туннельном микроскопе это взаимодействие проявляется в протекании постоянного тока в туннельном контакте. В основе атомно-силовой микроскопии лежит взаимодействие зонда и образца с силами притяжения или отталкивания. Можно упомянуть о таких разновидностях зондовых микроскопов, как магнитно-силовой микроскоп [9] (зонд и образец взаимодействуют с магнитными силами), микроскоп ближнего поля [10] (оптические свойства образца детектируются через миниатюрную диафрагму, находящуюся в *ближней зоне* источника), поляризационный

[1] не всегда речь идет о механическом контакте

[2] при помощи системы обратной связи

силовой микроскоп [11] (с образцом взаимодействует проводящий заряженный зонд) и т.д.

Миниатюрные размеры зонда и высокая чувствительность детектирующей системы позволяет достигать в зондовой микроскопии нано- и субнанометрового пространственного разрешения при детектировании поверхностных свойств[3)].

1.1. Общие принципы работы сканирующего зондового микроскопа

Процесс сканирования осуществляется при помощи пьезокерамического манипулятора[4)]. Зонд движется последовательно, строка за строкой, вдоль поверхности (изменяются координаты X и Y). Для оцифровки данных участок сканирования разбивается на N строк, а каждая строка на M точек, таким образом положение иглы в плоскости XY описывается двумя координатами X_i, Y_j из множества $\{X_i, Y_j\}$ $N \times M$ точек (обычно выбирают $N = M$). Результатом работы сканирующего зондового микроскопа является установление соответствия между каждой парой координат из множества $\{X_i, Y_j\}$ и некоторым числовым значением (или рядом значений), характеризующим анализируемый параметр поверхности (или ряд параметров).

По способу движения иглы над поверхностью можно провести следующую дифференциацию работы СЗМ.

- Если зонд движется над поверхностью при постоянной координате Z, то говорят, что сканирование осуществляется по способу *постоянной высоты*. В этом случае в каждой точке из множества $\{X_i, Y_j\}$ измеряется *интенсивность* рабочего взаимодействия $\Phi_{ij}|_{Z=const}$. Результатом исследования является массив[5)] $\{\Phi_{ij}|_{Z=const}, X_i, Y_j\}$, описывающий зависимость функции двух переменных $\Phi|_{Z=const}(X, Y)$.

[3)] Разрешающая способность прибора, как правило, тем выше, чем более короткодействующий характер имеет взаимодействие зонда и образца.

[4)] или системы манипуляторов

[5)] или несколько массивов, если в каждой точке измерялись несколько параметров

- Если же *система обратной связи* фиксирует в процессе сканирования на заданном уровне величину рабочего взаимодействия $A(X, Y, Z)$ вариацией вертикальной Z координаты зонда, то говорят, что сканирование осуществляется по способу *постоянного взаимодействия*. Результатом работы СЗМ в этом режиме будет массив $\{Z_{ij}|_{A=const}, X_i, Y_j\}$, коррелирующий с топографией исследуемой поверхности. Помимо «топографического» массива, можно, проводя в каждой точке измерения какого-либо дополнительного параметра (или нескольких), получать зависимости вида $\Phi_{ij}|_{A=const}(X_i, Y_j)$.

Таким образом, результатом СЗМ-исследования является получение функциональных зависимостей двух типов: по способу постоянной высоты: $\Phi|_{Z=const}(X, Y)$, и по способу постоянного взаимодействия: $Z|_{A=const}(X, Y)$ («топография»), плюс какая-либо дополнительная зависимость $\Phi|_{A=const}(X, Y)$. С помощью компьютерного программного обеспечения можно проводить анализ полученных зависимостей (анализ характерных латеральных и вертикальных размеров поверхностных особенностей, построение сечений, фурье-анализ, оценка шероховатости и т.п.), отображать полученные зависимости на экране монитора и выводить их на принтер.

При строгом рассмотрении, следует учитывать отличие «топографического» массива, полученного в режиме постоянного взаимодействия: $\{Z_{ij}|_{A=const}, X_i, Y_j\}$ от реальной топографии поверхности. Подобный анализ позволяет отследить ряд механизмов возникновения *артефактов*. В случае неоднородного распределения поверхностных свойств, определяющих интенсивность взаимодействия зонда и образца, для извлечения точной информации о топографии объекта необходимо в каждой точке проводить дополнительный анализ взаимодействия зонда и образца.

Например, в туннельной микроскопии реальная геометрия поверхности и карта поверхностного распределения электронных свойств могут быть полностью [12] реконструированы путем анализа трех измеряемых массивов: «топографии» в режиме постоянного взаимодействия, первой производной туннельного тока по напряжению смещения и первой производной туннельного тока по величине туннельного зазора.

1.2. Сканирующая туннельная микроскопия

В сканирующем туннельном микроскопе взаимодействие зонда и поверхности проявляется в протекании постоянного тока в туннельном зазоре между ними. Для плотности туннельного тока (в приближении плоских металлических электродов и вакуумного туннелирования) справедлива формула [13]:

$$j_t = \frac{3e^2 k_0}{4\pi h s} U_t \exp\left(-2k_0 s\right), \tag{1.1}$$

где e — заряд электрона, h — постоянная Планка, s — расстояние зонд-образец, U_t — разность потенциалов на туннельном контакте, k_0 — константа затухания волновых функций электронов в контакте:

$$k_0 = \sqrt{\frac{2m\varphi}{h^2}} \tag{1.2}$$

где m — масса электрона, φ — эффективная высота потенциального барьера.

Из анализа формулы (1.1) следует, что при изменении расстояния зонд-образец на один ангстрем величина туннельного тока изменяется на порядок. Поскольку величина взаимодействия зонд-образец столь существенно зависит от расстояния d, то это позволяет системе обратной связи поддерживать величину d постоянной в процессе сканирования с высокой точностью. Данное обстоятельство обуславливает высокое пространственное разрешение СТМ при определении «топографической» функции $Z|_{I_t=const}(X, Y)$.

Наряду этой зависимостью — «топографией в режиме постоянного тока» — в СТМ возможно получение зависимостей типа $\Phi|_{Z=const}(X, Y)$ или $\Phi|_{A=const}(X, Y)$. К первому типу относятся «токовые» изображения, полученные в режиме постоянной высоты: $I_t|_{Z=const}(X, Y)$. Ко второму типу относятся: $d\ln(I_t)/d\,z|_{I_t=const}(X, Y)$ и $d\,I_t/d\,U|_{I_t=const}(X, Y)$, связанные с поверхностным распределением работы выхода $\varphi(X, Y)$ (1.1) и поверхностным распределением плотности электронных состояний $\rho(X, Y, E_f \pm eU)$. Последнее определяется формулой [14]:

$$I_t(X, Y, Z) \cong \int\limits_{E_f}^{E_f+eU} \rho(X, Y, E)\, T(E, eU, Z)\, dE, \tag{1.3}$$

где $T(E, eU, Z)$ — коэффициент прозрачности барьера, E_f — уровень Ферми.

Получение функциональных зависимостей $d\ln(I_t)/dz|_{I_t=const}(X, Y)$ и $dI_t/dU|_{I_t=const}(X, Y)$ позволяет учесть их вклад в несовпадение $Z|_{I_t=const}(X, Y)$ с реальной топографией исследуемой поверхности.

1.3. Атомно-силовая микроскопия

В атомно-силовом микроскопе [5] взаимодействие $A(X, Y, Z)$ является *силовым* взаимодействием зонда и образца.

1.3.1. Силовое взаимодействие зонда и образца

Физическая природа и характер данного взаимодействия в общем случае достаточно сложны, поскольку они определяются свойствами зонда, образца и среды, в которой проводится исследование. В случае исследований *незаряженных* поверхностей в естественной атмосфере основной вклад в силовое взаимодействие зонда и образца дают: силы отталкивания, вызванные механическим контактом крайних атомов зонда и образца, силы Ван-дер-Ваальса, а также капиллярные силы, связанные с наличием пленки адсорбата (воды) на поверхности образца.

Силы Ван-дер-Ваальса

Зонды для атомно-силового микроскопа имеют форму конуса или пирамиды (рис. 1.1), кончик характеризуется радиусом кривизны R, лежащим, согласно данным фирм-производителей, в диапазоне $5 \div 40$ нм, см. таблицу А.1 на стр. 227.

Вычисляя дисперсионное взаимодействие зонда, изображенного на рис. 1.1а, и плоского образца в приближении[6]:

$$d \ll R \ll h, \tag{1.4}$$

пренебрегая членами порядка d/R и более высокого порядка малости, для величины силы ван-дер-ваальсового притяжения имеем формулу,

[6] и в приближении аддитивности дисперсионного взаимодействия

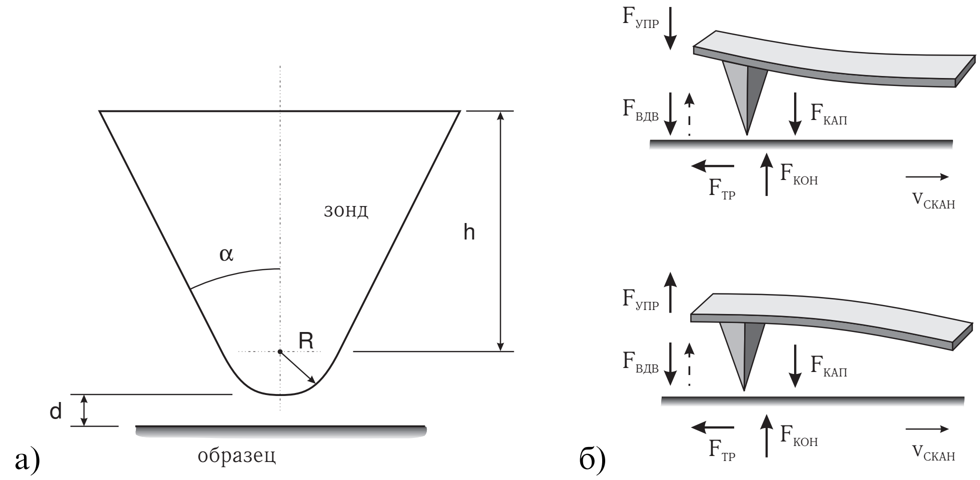


Рис. 1.1. Обобщенная геометрия зонда атомно-силового микроскопа и баланс силового взаимодействия зонда и образца;

а) h — высота зонда, R — радиус кривизны кончика, d — расстояние между зондом и образцом. Типичные параметры промышленных зондов (более подробно в таблице А.1 на стр. 227): $h \sim 3 \div 15$ мкм, $R \sim 5 \div 40$ нм, $\alpha \sim 10 \div 35°$;
б) указаны силы, действующие на зонд: дисперсионные $F_{B\partial B}$, капиллярные $F_{кап}$, силы трения $F_{тр}$, упругие силы, обусловленные прямым или обратным изгибом кантилевера $F_{упр}$, а также контактными деформациями образца $F_{кон}$

совпадающую с полученной Гамакером [15] для взаимодействия сферы и плоскости:

$$F_{\textit{ВдВ}} \simeq \frac{AR}{6d^2}, \tag{1.5}$$

где d — расстояние между зондом и образцом, R — радиус кривизны зонда, A — константа Гамакера:

$$A = \pi^2 \rho_1 \rho_2 \beta. \tag{1.6}$$

Здесь ρ_1 и ρ_2 — плотности материалов зонда и образца, β — константа в законе Лондона [16] для энергии дисперсионного взаимодействия двух нейтральных атомов в вакууме:

$$U = -\frac{\beta}{r^6}. \tag{1.7}$$

Для данной константы справедлива оценка $\beta \sim \alpha_1 \alpha_2 E_{\textit{атом}}$, где α_1 и α_2 — поляризуемости взаимодействующих атомов, $E_{\textit{атом}} \sim me^4/\hbar^2$ — «атомная» энергия[7] (m и e — масса и заряд электрона). Воспользовавшись тем, что $\alpha \times \rho$ — величина безразмерная и для многих элементов имеет порядок $1/10$, получим оценку для константы Гамакера: $A \sim E_{\textit{атом}}/10 \sim 10^{-19}$ Дж. Экспериментально измеренные значения константы Гамакера для различных материалов по порядку величины совпадают с выписанной оценкой [17]: $A_{\textit{эксп}} \sim (0{,}4 \div 4) \times 10^{-19}$ Дж.

Проводя оценки для типичных условий АСМ-эксперимента в режиме контакта, получаем для величины ван-дер-ваальсового притяжения: $F_{\textit{ВдВ}} \sim 10^{-8} \div 10^{-9}$ Н.

Стоит отметить, что предположение об аддитивности дисперсионного взаимодействия, сделанное Гамакером при выводе формулы (1.5), вообще говоря, необосновано. Другие существующие теории (например, подход Лифшица [18], связывающий интенсивность дисперсионного взаимодействия с диэлектрическими проницаемостями материалов взаимодействующих тел и среды исследования) позволяют объяснить экспериментально наблюдаемые в ряде случаев[8] силы дисперсионного *отталкивания* [19]. Однако несмотря на то, что природа дисперсионного взаимодействия достаточно понятна, разработать точный подход к описанию явления оказалось трудно, и поэтому современные теории

---

[7] совпадает по порядку величины с потенциалом ионизации

[8] при адекватном выборе материалов взаимодействующих тел и среды, в которой осуществляется взаимодействие

являются приблизительными или модельными; вследствие этого совпадение в реальном исследовании расчетных и экспериментальных данных *по порядку величины* считается вполне удовлетворительным [20].

Капиллярные силы

Ввиду наличия адсорбированной пленки воды на исследуемой поверхности[9)], при проведении АСМ-экспериментов на воздухе между зондом и образцом формируется мениск, что приводит к возникновению дополнительной силы притяжения между контактирующими поверхностями [21]:

$$F_{кап} = \frac{4\pi R\gamma \cos\theta}{1 + D/d}. \tag{1.8}$$

где R — радиус кривизны зонда (около 10 нм, см. таблицу А.1), γ — поверхностное натяжение пленки адсорбата (для воды $\gamma \sim 0{,}073$ Дж/м), θ — контактный угол для материала зонда (образца) и пленки, D — расстояние зонд-образец, d — глубина погружения зонда в пленку.

Приведенные значения позволяют по порядку величины оценить величину капиллярных сил в режиме контакта АСМ-исследований: $F_{кап} \sim 10^{-8}$ Н.

Гидрофобный эффект

Сущность этого эффекта — в возникновении интенсивных сил притяжения между двумя гидрофобными поверхностями, находящимися в водной среде. В настоящее время считается, что этот эффект носит сложный характер и при различных условиях может быть обусловлен различными механизмами, проявляющимися, тем не менее, одинаково. Согласно имеющимся представлениям, вклад в эффект могут давать энтропийные процессы, связанные со структурным упорядочиванием молекул воды вблизи гидрофобной поверхности [22], термодинамические процессы, связанные с возрастанием роли субкритических флуктуаций в зазоре [23] и пр.

[9)] при условии ее достаточной гидрофильности

1.3.2. Принцип работы АСМ

Деление АСМ по способу измерения и фиксации силового взаимодействия зонда и образца позволяет выделить два основных случая: контактная атомно-силовая микроскопия и АСМ прерывистого контакта.

Контактная атомно-силовая микроскопия

Для измерения величины силового взаимодействия в контактном режиме используется следующая схема, включающая в качестве миниатюрного динамометра упругую консоль (называемую *левером* или *кантилевером*), имеющую на свободном конце зонд (другой конец левера заделан в держателе). При сканировании баланс сил взаимодействия зонда и образца приводит к изгибу левера (т.е. сумма всех сил уравновешивается упругой силой изогнутого левера, см. рис. 1.1б); величина изгиба детектируется прецизионным датчиком. В большинстве атомно-силовых микроскопов для этого используют оптические датчики, реализованные по следующей схеме: луч лазерного диода падает под углом на поверхность левера и отражается в центр четырехсекционного фотодиода (рис. 1.2). При изгибе левера в нормальном направлении или при его кручении возникает разница в сигналах соответствующих участков фотодиода: верхние сегменты/нижние сегменты или правые сегменты/левые сегменты. Первый сигнал несет информацию о балансе сил притяжения и отталкивания, а второй — о латеральных силах взаимодействия зонда и образца (рис. 1.3).

В процессе *сканирования* система *обратной связи* поддерживает на заданном уровне величину изгиба кантилевера (следовательно, и силы воздействия зонда на образец) посредством вариации Z-координаты точки закрепления кантилевера. Сигнал обратной связи несет, таким образом, информацию о топографии поверхности $Z|_{F=const}(X, Y)$.

Упругая сила изгиба кантилевера, действующая на зонд, может быть направлена как в сторону образца, так и в обратную (прямой и обратный изгиб кантилевера, см. рис. 1.1б); в первом случае она увеличивает давление зонда на образец, во втором уменьшает. Как правило, при сканировании стремятся уменьшить воздействие на образец, для чего выбирают минимальную величину прямого изгиба кантилевера, или, по мере возможности, максимальную величину обратного изгиба кантилеве-

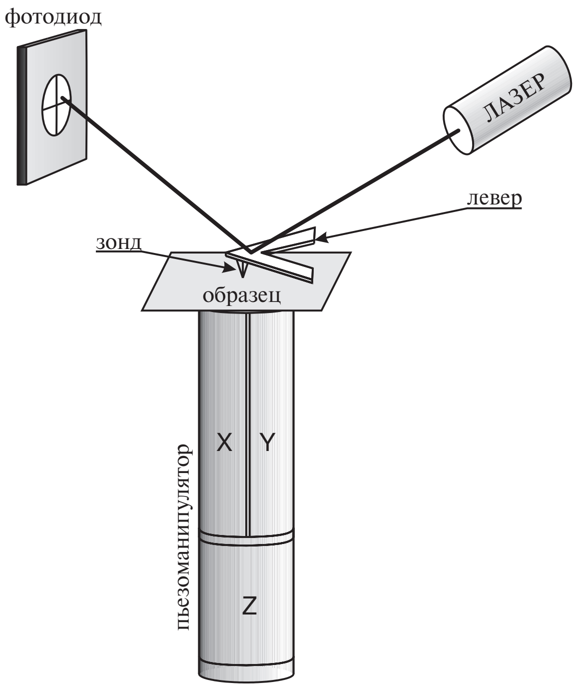


Рис. 1.2. Основные узлы механической части атомно-силового микроскопа

Изображены: полупроводниковый лазерный диод, упругая консоль (кантилевер) с зондом на свободном конце, четырехсегментный фотодиод, пьезокерамическая трубка (манипулятор относительных перемещений зонда и образца, осуществляемых под управлением сигналов на X, Y и Z-электродах)

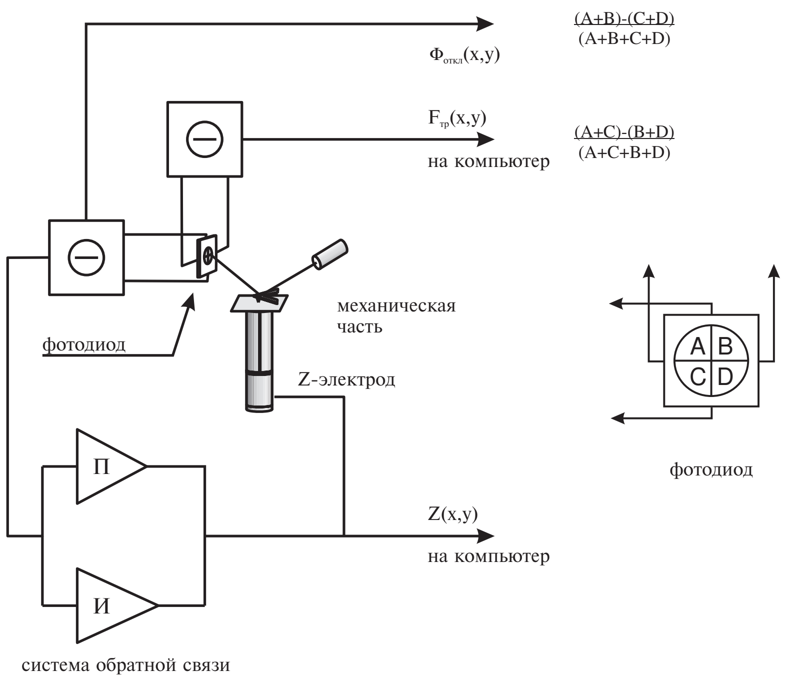


Рис. 1.3. Основные элементы атомно-силового микроскопа

Изображены: пропорциональное и интегральное звенья системы обратной связи, управляющей напряжением на Z-электроде, механическая часть микроскопа, четыре сегмента детектирующего фотодиода; показаны сигналы, направляемые для построения АСМ-изображений на компьютер (в режиме контактной АСМ): сигнал отклонений $\Phi_{откл}(X,Y)$, сил трения $F_{тр}(X,Y)$ и топографический сигнал $Z|_{F=const}(X,Y)$

ра, при которой еще сохраняется механический контакт. Сканирование при обратном изгибе может быть нестабильным. Если силы притяжения (капиллярные, дисперсионные) действуют на зонд неодинаково на всем участке сканирования, то в тех местах, где они меньше, зонд может «оторваться» от поверхности (выйти из контакта[10)]), если величина упругих сил обратного изгиба превысит силы притяжения. Это обстоятельство является основным препятствием при минимизации силы воздействия зонда.

Разница сигналов правых и левых сегментов фотодиода отображает величину сил трения, действующих на зонд при сканировании, что позволяет исследовать распределение локальных фрикционных свойств поверхности. Информацию о градиенте к исследуемой поверхности несет сигнал *отклонений* $\Phi_{откл}(X, Y)$ детектируемый при сканировании как разностный сигнал верхних и нижних сегментов фотодиода, см. рис. 1.3. Оказывается, что в эксперименте зависимости $F_{тр}(X, Y)$ и $\Phi_{откл}(X, Y)$ часто характеризуются большей латеральной разрешающей способностью, чем топографический сигнал $Z|_{F=const}(X, Y)$, в силу чего оказывается возможным детектирование более мелких деталей поверхности; поэтому именно эти сигналы мы использовали при визуализации атомной или молекулярной упаковки поверхности (раздел 5.3).

Некоторые ограничения. Используемая схема измерения силового взаимодействия в АСМ проста и удобна, но в некоторых случаях *силы трения* между зондом и образцом могут искажать «топографический» сигнал, см. рис. 1.4.

В случае, когда направление сканирования совпадает с осью левера, карта поверхностного распределения сил трения будет напрямую накладываться на карту измеряемой «топографии» поверхности, поскольку действие сил трения будет варьировать разностный сигнал верхних и нижних сегмента фотодиода (именно этот сигнал фиксируется системой обратной связи).

В случае, когда направление сканирования перпендикулярно оси левера, действие сил трения сведется к вариации крутильного изгиба левера и проявится в разностном сигнале правых и левых сегментов фотодиоа, что позволяет различать вклад нормальных и латеральных сил. Од-

[10)] и система обратной связи не сможет восстановить контакт в этом случае

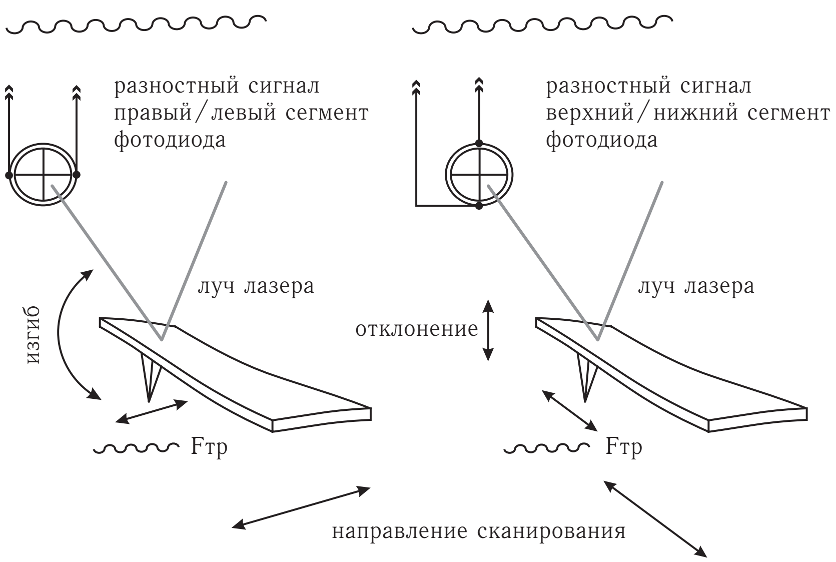


Рис. 1.4. Объяснения влияния поверхностного распределения фрикционных свойств на топографическое АСМ-изображение;

а) когда направление сканирования перпендикулярно оси левера, вклад сил трения приводит к изменению крутильного изгиба левера и проявляется в разностном сигнале правых и левых сегментов фотодиода

б) когда направление сканирования и ось левера сонаправлены, вклад сил трения приводит к изменению вертикального отклонения левера и проявляется в разностном сигнале верхнего и нижнего сегмента фотодиода, накладываясь на общий топографический сигнал нако в реальности и в этом случае фрикционный сигнал может накладываться на топографический, что может быть обусловлено асимметрией фокусировки лазерного луча относительно оси левера или асимметрией ориентации левера (и зонда) относительно подложки. Эти артефакты могут искажать результаты АСМ-измерения высот объектов. Отследить их возникновение можно, анализируя зависимость измеряемых высот от направления сканирования.

Разрешающая способность АСМ. При сканировании обратная связь фиксирует разностный сигнал верхних и нижних сегментов фотодиода, нормированный на величину суммарного сигнала всех сегментов фотодиода. Это исключает влияние шумов лазерного диода на точность измерения изгиба кантилевера. Влияние сейсмических шумов в достаточной степени исключается использованием простейших антисейсмических фильтров: например, демпфирующей каучуковой прокладкой под гранитным основанием, на котором устанавливается прибор[11]. Поэтому разрешающая способность атомно-силового микроскопа по нормали (в направлении Z) ограничена другими шумами: пьезоманипулятора, кантилевера и электронного блока (предусилителя, цепи обратной связи и высоковольтных усилителей[12]).

Критерием разрешающей способности *по нормали* может служить минимальное изменение Z-координаты иглы при сканировании, детектируемое на уровне шумов. Последний существенно зависит от параметров сканирования (скорости, параметров пропорционального и интегрального звеньев цепи обратной связи, размера кадра), а также от вязкоупругих свойств исследуемого образца. Для используемого в работе АСМ «Nanoscope-IIIa» (Digital Instruments, США) мы оцениваем предел разрешения по нормали на уровне долей–единиц ангстрем (в зависимости от параметров эксперимента).

Процедура определения разрешающей способности в латеральном направлении не устоялась. Представляется возможным определить ее следующим образом (рис. 1.5). Пусть зондирующее острие характеризуется радиусом кривизны R, а разрешаемые особенности поверхности — r (рис. 1.5). Тогда возможность латерального разрешения поверхност-

[11] эту схему мы использовали экспериментах

[12] задающих сигналы на электродах пьезоманипулятора, см. рис. 1.2

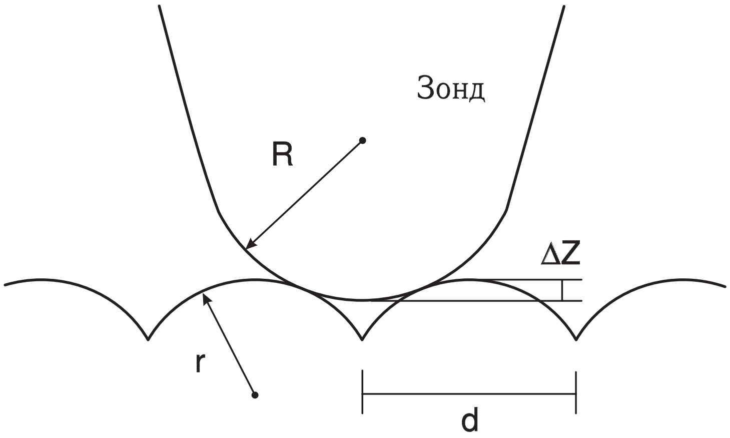


Рис. 1.5. К определению латеральной разрешающей способности АСМ;

если Δz — предел разрешения по нормали, то d — искомый латеральный предел разрешения; R и r — радиусы кривизны зонда и разрешаемых объектов

ных особенностей будет связана с пределом разрешения по нормали Δz: критерием разрешения является условие возможности детектирования разницы в значениях вертикальной координаты иглы над объектами и между ними. Геометрический анализ рис. 1.5 позволяет получить соотношение для минимального расстояния между разрешаемыми поверхностными особенностями, при котором «провал» между ними на АСМ-изображении еще может быть детектирован (т.е., когда он равен пределу Δz):

$$d = \sqrt{8(R + r)\Delta z}. \tag{1.9}$$

Поскольку достижимое пространственное разрешение должно являться инвариантной характеристикой прибора[13)], то его следует определить, рассматривая условие детектирования двух точечных объектов ($r = 0$). Тогда соотношение (1.9) примет вид:

$$d = \sqrt{8R\Delta z}, \tag{1.10}$$

связывая предел разрешения в латеральном направлении d с пределом разрешения по нормали Δz и радиусом кривизны зондирующего острия R.

Стоит отметить, что введенная процедура определения латерального пространственного разрешения упрощена и не учитывает, например,

[13)] не зависящей от объекта исследования влияния зонда на структуру объекта (за счет контактных деформаций). Введенная процедура, по-видимому, неприменима при определении разрешающей способности в исследованиях молекулярной (атомной) структуры поверхности (см. раздел 2.1.5).

Отдельно следует подчеркнуть отличие предложенного подхода от процедуры определения разрешающей способности оптических приборов, когда используют критерий Релея, соответствующий тому, что освещенность между изображениями детектируемых точек составляет 74% максимальной. То есть для оптического прибора берут в расчет *относительную* величину провала между изображениями объектов. В случае АСМ важна *абсолютная* глубина провала — она должна быть детектируемой на уровне шумов. Это различие является следствием того, что оптические изображения формируются путем сложения интенсивностей изображений отдельных объектов (принцип *и*), напротив, АСМ-изображение формируется путем исключения вклада в изображение более «низких» поверхностных особенностей (принцип *или*).

АСМ прерывистого контакта

Для измерения и фиксации при сканировании интенсивности силового взаимодействия зонда и образца в АСМ *прерывистого контакта*[14)] используется резонансная схема. Дополнительный пьезоэлемент возбуждает вынужденные колебания левера на его резонансной частоте (вдали от поверхности образца). При сближении зонда и образца возникновение дополнительного градиента сил их взаимодействия приводит к сдвигу резонансной частоты (изменению эффективной жесткости) и частичному выходу системы из резонанса. Наряду с этим, при соударениях зонда и образца увеличивается демпфирование колебаний за счет неупругих процессов. Следствием обоих механизмов является уменьшение амплитуды колебаний.

При сканировании АСМ в режиме прерывистого контакта система обратной связи поддерживает на заданном уровне именно величину *амплитуды колебаний*: $\Delta z = const$. В силу высокой чувствительности амплитуды колебаний к среднему значению расстояния между зондом и образцом, можно получать информацию о топографии поверхности

[14)] в англоязычной литературе используют термин *tapping mode*

($Z|_{\Delta z=const}(X,Y)$) с достаточно высоким пространственным разрешением.

Информация о тонкой структуре (и локальных вязкоупругих свойствах) исследуемой поверхности может быть получена из измерений зависимости: $\Delta\varphi|_{\Delta z=const}(X,Y)$, где $\Delta\varphi$ — сдвиг фаз между колебаниями левера и внешней вынуждающей силы. Вдали от поверхности колебательная система настраивается в резонанс ($\varphi = \pi/2$), однако при сближении зонда и образца она, частично, выходит из резонанса и вклад в сдвиг фаз будут давать упругие (изменение резонансной частоты) и диссипативные (увеличение декремента затухания) механизмы. Оказывается, что в ряде случаев сигнал $\Delta\varphi|_{\Delta z=const}(X,Y)$ характеризуется большей латеральной разрешающей способностью, чем топографический $Z|_{\Delta z=const}(X,Y)$, позволяя разрешить более мелкие детали поверхности.

Стоит отметить, что в настоящее время не существует законченной теории АСМ прерывистого контакта, которая позволяла бы количественно связать параметры эксперимента (величину амплитуды и сдвига фаз колебаний левера) с интенсивностью силового воздействия зонда на образец и с локальными вязкоупругими свойствами образца. Это обстоятельство осложняет количественную интерпретацию фазовых АСМ-изображений ($\Delta\varphi|_{\Delta z=const}(X,Y)$) микроскопии прерывистого контакта.

АСМ модуляции силы

Метод модуляции силы мы рассмотрим применительно к атомно-силовой микроскопии контакта[15]. В этом случае общая схема измерений такова. Как и в микроскопии прерывистого контакта в экспериментальную схему введен дополнительный пьезоэлемент (*биморф*), который возбуждает колебания левера, но в этом случае не на его резонансной частоте, а на резонансной частоте самого *биморфа* (существенно более массивного). Данное обстоятельство приводит к тому, что, в отличие от АСМ прерывистого контакта, в этом случае силовое взаимодействие зонда и образца *не влияет* на собственную резонансную частоту системы (система не выходит из резонанса в случае, когда проявляется взаимодействие зонда и образца).

[15] есть экспериментальные схемы, позволяющие реализовать режим модуляции силы и в микроскопии прерывистого контакта, см. `http://www.di.org`

Как и в контактной АСМ в процессе сканирования система обратной связи поддерживает на заданном уровне изгиб кантилевера. Но в этом случае фиксируется среднее за период значение изгиба, поскольку кантилевер совершает вынужденные колебания. Величина амплитуды колебаний будет зависеть от упругих свойств поверхности: более жесткие участки поверхности будут «продавливаться» в меньшей степени и там амплитуда колебаний будет меньше.

Как и для микроскопии прерывистого контакта в настоящее время не существует удовлетворительной теории, позволяющей проводить количественный анализ упругих свойств поверхностей на основании анализа АСМ-изображений, полученных в режиме модуляции силы.

Поэтому в литературе по АСМ модуляции силы при интерпретации экспериментальных результатов ограничиваются лишь *качественным* анализом, привлекая некоторые модельные представления. Однако в ряде случаев отмечена неоднозначность в интерпретации. Так, авторы работы [24] воспользовались *теорией контактных деформаций* с тем, чтобы установить качественную связь между величиной амплитуды колебаний и локальным значением модуля упругости поверхности (подробнее вопросы применения теории контактных деформаций к исследованиям АСМ рассмотрены нами в разделе 2.1).

Теория позволяет (см. стр. 55) установить связь между сближением за счет деформации h, величиной силы воздействия зонда F и локальным значением эффективного модуля Юнга E^* (который в приближении *жесткого* зонда совпадает с модулем Юнга образца):

$$h \sim const \times \left(\frac{F}{E^*}\right)^{2/3}$$

При изменении силы воздействия зонда по закону $F \sim F_0 + \Delta F \cos \omega t$ в первом приближении величина деформации будет определяться: $h \sim h_0 + \Delta h \cos \omega t$. Это позволяет сделать вывод, что на более жестких участках поверхности ($E_1 > E_2$) величина амплитуды колебаний левера будет меньше ($\Delta h_1 < \Delta h_2$). Однако авторы работы делают противоположный вывод, основываясь на тех же формулах контактной теории, но опуская необходимые комментарии, которые могли бы прояснить возникновение различия в интерпретации.

Авторы работы [25], также используя формулы контактной теории деформаций, вводят параметр *жесткость*:

$$S = \partial F/\partial h = \alpha a E^*,$$

где F — сила нагрузки, h — глубина проникновения зонда в образец (сближение за счет деформации), a — радиус области контакта, E^* — эффективный модуль Юнга, α — константа (в формулах стр. 55 $\alpha = 2$).

Ход рассуждений авторов таков: более мягкие образцы характеризуются меньшим E^*, однако для них больше радиус области контакта $<a>$ (среднее значение). Далее авторы утверждают, что жесткость может быть большей для более мягких образцов, если в выписанном соотношении доминирует (?) вклад радиуса контактной области. С этим утверждением нельзя согласиться, поскольку формулы контактной теории ($a = (FDR)^{1/3}$, см. стр. 55) позволяют получить соотношение:

$$S \sim F^{1/3} \times (E^*)^{2/3},$$

откуда с очевидностью следует, что для более мягких образцов жесткость меньше; но это и *естественно* в силу физического смысла жесткости.

Отсюда, как мы и указывали выше, следует, что на более мягких участках поверхности амплитуда колебаний левера Δh в АСМ модуляции силы будет больше:

$$\Delta h \sim \frac{1}{\partial F/\partial h} \times \Delta F \sim \Delta F/S$$

Авторы рассматриваемой работы приходят *к такому же выводу* при интерпретации экспериментальных результатов, поскольку допускают, напротив, что амплитуда колебаний больше в случае большего S.

Т.о. адекватное применение контактной теории деформаций может быть полезным для АСМ, поэтому мы в разделе 2.1 рассматриваем результаты этой теории применительно к интерпретации экспериментальных данных. В разделе 5.2 приведены экспериментальные результаты качественного анализа методом модуляции силы упругих свойств материалов (сравнение жесткости белковой пленки и подложки), подтверждающие справедливость нашей интерпретации формирования изображений в рассматриваемом методе.

1.4. Основные методы исследования биологических и органических объектов и структур

В настоящее время в арсенале исследователей, изучающих биологические и органические структуры, имеется широкий спектр различных физических методов исследования, многие из которых давно стали рутинными, и без которых не обходится ни одно широкомасштабное научное исследование в этой области. Для того, чтобы прояснить возможности и перспективы метода сканирующей зондовой микроскопии и обозначить ее место в ряду других методов исследования, ниже приведена краткая характеристика основных экспериментальных подходов к исследованию биологических и органических структур.

Дифракционные методы

К дифракционным относятся методы реконструкции реальной структуры объекта путем анализа дифракции взаимодействующего с ним пучка электронов, нейтронов или рентгеновский лучей: математическая обработка дифракционной картины позволяет решить обратную задачу и восстановить структуру объекта. Принципиальная трудность метода заключается в невозможности получения непосредственно из эксперимента информации о фазах дифрагировавших лучей. Один из возможных путей решения данной проблемы — использование меток — атомов тяжелых металлов, присоединяемых к определенным группам исследуемого объекта. Так, последовательное мечение различных специфических групп гемоглобина позволило получить необходимую информацию для расчета структуры этого белка [26] по данным *рентгеноструктурного* анализа его кристаллов. Этот метод нашел применение и при исследовании некристаллических (например, волокнистых) структур. Именно по косвенным рентгеноструктурным данным Уотсон и Крик впервые определили для молекулы ДНК диаметр и параметры спирали (наличие 10 эквивалентных групп в одном обороте, равном 3,4 нм). На основании этих результатов ими и была впервые предложена общепринятая ныне модель строения молекулы ДНК [27].

Дифракционные методы успешно используются и для анализа свойств *поверхности*, позволяя достигать высокой точности в определении реконструируемых пространственных параметров (при условии достаточной упорядоченности исследуемой структуры). Особенно широко используется метод *электронографии*, поскольку, из-за сильного взаимодействия электронов с веществом, определяющим в дифракционной картине является вклад именно ближайших к поверхности атомных слоев. В случае рентгеноструктурных исследований поверхности приходится использовать «скользящую» геометрию падающего луча и достаточно мощный источник излучения.

Метод рентгеноструктурного анализа применим и для исследований систем частиц, расположение которых не характеризуется ближним или дальним порядком: в этом случае анализируют рассеяние рентгеновских лучей под *малыми углами*. Этот подход позволяет определять либо форму, либо размеры микрообъектов системы (для решения задачи какая-то информация должна быть известна [28]). Если объекты исследуемого ансамбля характеризуются некоторым распределением по параметру, через который выражается искомый, то точность его восстановления ограничена. Например, при восстановлении формы частиц, разброс их по размерам резко снижает точность решения обратной задачи (если оно вообще может быть найдено) [28], и наоборот. Дополнительная информация, необходимая для корректной постановки обратной задачи, может быть получена с помощью других методов исследования — в том числе сканирующей зондовой микроскопии.

Электронная микроскопия

Метод *электронной микроскопии* (ЭМ), за годы своего существования, был дополнен множеством вспомогательных методик препарирования образцов для исследований биообъектов [29]. Проблема в том, что биообъекты состоят из веществ с малыми атомными номерами, следствием чего является малое число рассеянных электронов и, в итоге, отсутствие разрешения. Сегодня наиболее часто используемые способы контрастирования биообъектов для ЭМ-исследований — это приготовление реплик, оттенение запылением металлами, «окрашивание» отдельных частиц и молекул ионами тяжелых металлов. Высокое разрешение дает предложенный Холлом [30] метод негативного контрастирования, принцип которого состоит в помещении исследуемых образцов в пленку аморфного вещества высокой плотности[16)].

При исследовании *нуклеиновых кислот* методом ЭМ важной проблемой является методика нанесения исследуемых структур на подложку. При высушивании капли разбавленного раствора молекул на поверхности наиболее часто используемых в ЭМ подложек (коллодий, формвар, углерод) происходит агрегация исследуемых структур. Нанесение молекул ДНК с помощью пульверизатора приводит к деградации исследуемых структур. Поэтому большое распространение получила методика Кляйншмидта и Цана [31], основанная на взаимодействии нуклеиновой кислоты с основными белками и способности этих белков образовывать монослой на поверхности раздела фаз воздух/водный раствор. Молекулы нуклеиновых кислот, связываясь с белковой пленкой, переходят из состояния трехмерного клубка в двумерное расправленное состояние на поверхности водной субфазы. Белковую пленку с молекулами нуклеиновой кислоты переносят на сетку, после чего применяют стандартные методы контрастирования и осуществляют исследование [32]. Недостатком метода является то, что белковая пленка, покрывающая молекулу, увеличивает ее «толщину» до 5–8 нм и затрудняет решение ряда задач (например, исследования взаимодействия нуклеиновых кислот с белками).

Существенной проблемой электронной микроскопии является большая вероятность возникновения артефактов, связанных с необходимостью использования специфических методик контрастирования и фиксирования биообъектов на подложке.

Зондовая микроскопия по общей схеме эксперимента близка ЭМ и для многих объектов позволяет достигать латерального разрешения, близкого к разрешению ЭМ. В то же время, латеральное разрешение СЗМ *по нормали* выше[17)], что позволяет успешно решать специфические задачи, весьма сложные для ЭМ: например, по увеличению высоты локального участка АСМ-изображения молекулы ДНК, детектировать местоположение *триплекса* в составе молекулы [33].

[16)] т.е. хорошо рассеивающего электроны

[17)] метод *запыления под углом* в ЭМ не дает высокой точности в определении высот объектов из-за конечного размера зерна запыления

Оптические методы

Оптические методы исследования получили в последнее время большое распространение (особенно с применением лазерного излучения). Среди наиболее часто используемых методик — *спектрофотометрия*, основанная на изменении спектра поглощения молекулы при димеризации (в общем случае — полимеризации) за счет взаимодействия соседних мономеров (в основном играет роль диполь-дипольное взаимодействие). Спектрофотометрия позволяет определять концентрации нуклеиновых кислот, определять степень спиральности и исследовать переход клубок $\rightarrow$ глобула. Однако результаты исследования чувствительны к наличию в растворе ионов, способных взаимодействовать с исследуемыми молекулами (в том числе протонов, определяющих pH среды). Это связано с возможностью влияния подобного взаимодействия на контролируемые в процессе исследования спектральные изменения. Для выяснения природы спектральных изменений необходимы вспомогательные эксперименты.

Наряду со спектрофотометрией в исследованиях биообъектов широко применяются инфракрасная спектроскопия, спектрополяриметрия, спектрально-флуоресцентные исследования и т.д. Общей чертой данных методик является их косвенный, непрямой (относительный) характер — результатом исследования является усредненный по ансамблю отклик объектов. Проблемой является и необходимость решения обратной задачи для извлечения информации об объекте, что, в ряде случаев, может привести либо к значительной погрешности в результатах, либо к неадекватности решения.

Отдельно следует упомянуть метод *флуоресцентной микроскопии*, который нашел применение при визуализации одиночных макромолекул в нативных условиях и исследовании изменений их морфологии в процессе взаимодействия с различными лигандами и пр. К недостаткам метода следует отнести невысокую пространственную разрешающую способность (ограниченную пределом оптического микроскопа $\lambda/2$, поэтому успешно можно исследовать лишь достаточно большие молекулы), и необходимость комплексообразования макромолекулы с молекулами флуоресцентного «красителя».

Гидродинамические методы

Широко используемые гидродинамические методы исследования биополимеров (вискозиметрия, седиментация, двойное лучепреломление в потоке) позволяют определить приближенную форму, размеры, молекулярный вес и деформируемость исследуемых молекул. Информация, получаемая с помощью гидродинамических методов, также является неабсолютной (усредненной по ансамблю), что подразумевает необходимость сравнения с результатами других методов исследования. Актуальной является проблема корректной постановки и решения обратной задачи для определения параметров объектов.

Место СЗМ в ряду других методов исследования

В этой связи методы сканирующей зондовой микроскопии призваны занять важное место в ряду традиционных исследовательских подходов к изучению биообъектов. Поскольку приборы зондовой микроскопии предназначены для исследования свойств *поверхности*, то стандартная схема СЗМ-исследования биообъектов включает использование достаточно ровной подложки (проводящей в случае СТМ), на которую осуществляется адсорбция изучаемых структур. Наиболее распространенные в сканирующей зондовой микроскопии подложки — атомарно гладкие сколы слюды, пирографита, дисульфида молибдена, а также эпитаксиально выращенные пленки металлов.

Необходимость использования подложки сближает методы СЗМ с электронной микроскопией. Основные отличия и преимущества сканирующей зондовой микроскопии в сравнении с ЭМ — возможность проведения исследований в различных средах (в том числе в жидкости), отсутствие необходимости какого-либо дополнительного контрастирования исследуемых структур, большая разрешающая способность по нормали, неразрушающий характер исследования (обусловленный невысокой интенсивностью взаимодействия зонд-образец). Т.о. процедура приготовления образцов для СЗМ проще и исследования можно проводить в условиях, близких к нативным.

Все это свидетельствует о том, что зондовая микроскопия является мощным современным методом исследования поверхности, призванным обеспечить дальнейшее развитие традиционным подходам. Результаты исследований последних лет убедительно продемонстрировали, что для решения многих задач метод зондовой микроскопии является самодостаточным (т.е. нет необходимости контрольного сравнения с результатами других исследований); к таковым задачам относятся, например, физическое картирование молекул нуклеиновых кислот [34], исследование изменения их морфологии в жидких средах, анализ их взаимодействия с белками [35, 36], анализ структуры тонкопленочных покрытий (см. главу 5) и пр.

Тем не менее, в процессе исследования большое внимание следует уделять возможным механизмам возникновения артефактов. Достаточно очевидным фактом является необходимость учитывать конечность размеров зонда, приводящую к завышению латеральных размеров исследуемых структур (раздел 2.2), а также эффект занижения высот, связанный с контактными деформациями (раздел 2.1). Кроме того, при исследовании многокомпонентных образцов, надлежит проводить дополнительный анализ каждой из компонент, с целью определения их парциального влияния на результат исследования, что позволит избежать ошибок в идентификации комплексов, полученных в результате взаимодействия исходных объектов.

Постановка адекватных контрольных экспериментов, безусловно, способствует уменьшению вероятности ошибки при интерпретации результатов СЗМ-исследований; избежать ошибки позволяет и сравнение с результатами других методов исследования (рассмотренных выше).

1.5. Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот

Среди множества биологических объектов, к исследованию которых применялись методы зондовой микроскопии, первой была молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты. Однако на начальном этапе этих исследований отмечались сложности в интерпретации получаемых изображений. Так, авторы работ [37, 38] представили данные сканирующей туннельной микроскопии молекул ДНК, адсорбированных на подложку из высокоориентированного пиролитического графита (пирографита). Выбор данного материала в качестве подложки был обусловлен его проводящими свойствами, а также простотой приготовления атомарно гладких участков поверхности значительной площади. На СТМ-изображениях наблюдались протяженные цепочки, обладающие продольной периодичностью (период около 2–3 нм), на основании чего авторы делали вывод о визуализации витков двойной спирали.

Однако позднее были опубликованы данные [39], свидетельствующие о возможности наблюдения сходных «ДНК-подобных» структур при исследовании методом СТМ чистой, свежесколотой поверхности пирографита. Возникновение таких структур объясняется чувствительностью СТМ к *электронным* свойствам поверхности — происходит визуализация доменных стенок пирографита [40]. Эти результаты, а также слабая воспроизводимость и отсутствие безусловно необходимых контрольных экспериментов в первых работах по СТМ-визуализации ДНК вызывали сомнения в применимости методов зондовой микроскопии для исследования макромолекул.

Существенное изменение ситуации произошло в 1992 г., когда были опубликованы первые надежные и воспроизводимые результаты исследования ДНК методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) [6, 41]. Таким образом, прошло более пяти лет с момента создания атомно-силового микроскопа (1986 г.) и более десяти лет существования зондовой микроскопии, прежде чем был достигнут определенный успех в применении метода к исследованию биологических объектов. В то же время методы зондовой микроскопии весьма успешно применялись в течение этих десяти лет для исследований структуры поверхности твердых (кристаллических) тел. За эти годы возникло понимание, что потенциал возможностей зондовой микроскопии в исследованиях *биологических объектов* может быть реализован лишь при решении в каждом конкретном случае основной экспериментальной задачи: определения адекватной *методики препарирования образцов*.

1.5.1. Основные методики препарирования образцов для зондовой микроскопии нуклеиновых кислот

Универсальной методики приготовления образцов для решения широкого спектра задач зондовой микроскопии пока не существует, поэтому используемые методики определяются спецификой задачи, т.е. являются методиками «на конкретный случай». Применительно к исследованиям нуклеиновых кислот во многих случаях бывает важно, чтобы макромолекулы адсорбировались на подложку в *расправленном* состоянии. Для успешного исследования необходимо также, чтобы исследуемые молекулы достаточно прочно фиксировались на подложке. В противном случае, при исследованиях в жидкой среде, молекулы будут увлекаться зондом в процессе сканирования; при исследовании на воздухе, силы, действующие на молекулу при высыхании капли препарата на подложке, также будут увлекать адсорбируемые структуры, приводя к неоднородному (с образованием агрегатов) поверхностному распределению исследуемых объектов. Ниже рассмотрим основные методики, позволяющие зафиксировать молекулы нуклеиновых кислот на поверхности в расправленном состоянии.

Первые надежные результаты исследования ДНК методом атомно-силовой микроскопии были получены в том случае, когда изучаемые структуры наносили из капли рабочего раствора (раствора буфера, водно-спиртовой среды и т.п.) на поверхность слюды, модифицированной ионами двух- (и более) валентных металлов [6, 41]. Эти ионы, по-видимому, служат связующими мостиками между отрицательно заряженной слюдой[18] и отрицательно заряженными фосфатными группами молекулы ДНК. Модификация слюды может предшествовать процессу адсорбции макромолекул — в этом случае свежесколотую слюду помещают для предварительной обработки на некоторое время (минуты, часы) в раствор, содержащий катионы металлов, затем промывают (водой, водным раствором этанола и пр.) и высушивают. После этого на модифицированную поверхность наносят рабочий раствор с исследуемыми структурами. Другой подход — добавление солей металлов непосредственно к рабочему раствору — позволяет исключить этап предварительной обработки слюды (препарат наносят непосредственно на поверхность свежего скола). После высыхания капли рабочего раствора образцы, как правило, подвергают дополнительной промывке.

В работе [42] методом АСМ проводили сравнительный анализ процесса адсорбции макромолекул ДНК на слюду из раствора, как с катионами металлов, так и без них. Было показано, что во втором случае адсорбированные молекулы нестабильны в процессе промывки образ-

[18] в водных растворах при используемых значениях pH

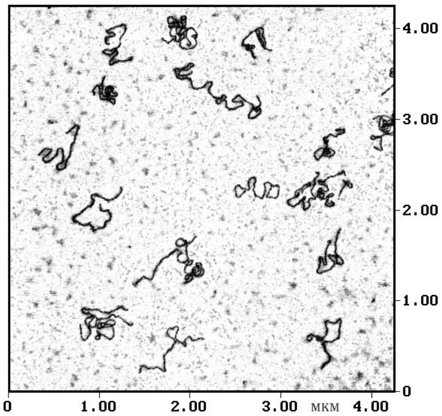
цов и при сканировании. Кроме того, АСМ-изображения макромолекул характеризуются большим количеством запутанных и перекрученных участков, тогда как при присутствии в растворе катионов металлов и применении предшествующей сканированию процедуры промывки образцов молекулы ДНК фиксируются на поверхности подложки в расправленном состоянии.

Авторы работы [43] исследовали методом АСМ в жидкостной ячейке в реальном масштабе времени *обратимое* осаждение молекул ДНК на слюду при различных параметрах рабочего раствора. Было показано, что адсорбция объектов на поверхность подложки и величина силы адгезии существенно зависят от концентрации связующих катионов (оптимальное значение около 2 мМ для Zn^{2+}) и pH среды (оптимальное значение около 7,5).

На сегодняшний день использование катионов металлов для связывания ДНК с подложкой является, пожалуй, наиболее распространенной методикой приготовления образцов при АСМ-исследованиях, что объясняется ее простотой и высокой воспроизводимостью результатов.

На рис. 1.6 представлены АСМ-изображения молекул ДНК, адсорбированных на поверхность слюды в присутствии катионов Ni^{2+} (а) или уранилацетата (б). Из рисунка видно, что молекулы зафиксированы на подложке в достаточно расправленном состоянии.

Приводимые изображения молекул характеризуются завышенными латеральными размерами — 10–15 нм — и заниженными вертикальными — около 0,7 нм, в то время как диаметр одиночной молекулы ДНК около 2 нм. Завышение латеральных размеров полученных изображений обусловлено конечной величиной радиуса кривизны зонда (количественная методика учета данного *артефакта* и определения реальной ширины объекта разработана в разделе 2.2). Причиной занижения вертикальных размеров может являться деформация молекулы под действием зонда (рассмотрение теории контактных деформаций и применение ее для описания эффекта занижения высот АСМ-профиля объекта приведено в разделе 2.1). Следует подчеркнуть, что эти артефакты являются *типичными* при АСМ-исследованиях молекул нуклеиновых кислот [44].

Другая широко используемая методика химической модификации подложки для стабилизации молекул нуклеиновых кислот на поверхности — это силанизация слюды [45]. Процесс силанизации существенно а) 

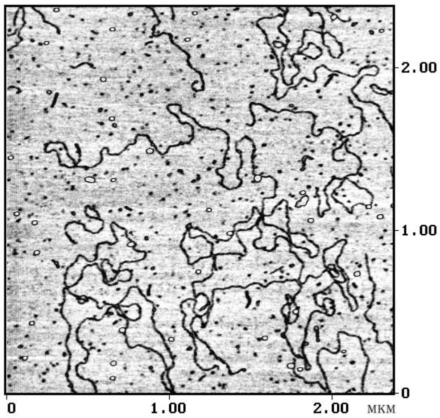
б) 

Рис. 1.6. Молекулы ДНК адсорбированы на подложку слюды, АСМ-исследование;

а) адсорбция в присутствии 1 мМ $NiCl_2$, образцы приготовлены совместно с M. Sc. Malin Ardhammar (Chalmers University of Technology, Sweden);

б) адсорбция в присутствии уранилацетата, образцы приготовлены к.ф.-м.н. Д. В. Клиновым и В. А. Прохоровым (Институт биоорганической химии, Москва)

не изменяет топографических особенностей поверхности слюды — она остается достаточно гладкой, в то же время улучшается связь макромолекулы с модифицированной подложкой. В работе [46] при проведении АСМ-исследований нуклеиновых кислот (ДНК, двунитевой рибонуклеиновой кислоты (РНК)) в качестве подложки использовали поверхность слюды, химически модифицированную 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES). Модификация включала ковалентную привязку аминогрупп молекул APTES к слюде, степень модификации контролировали с помощью АСМ, и выбирали таким образом, чтобы шероховатость получаемой поверхности не затрудняла идентификацию исследуемых структур. Это обстоятельство (необходимость контроля степени шероховатости модифицированной подложки) незначительно усложняет методику.

Было показано [47], что этот подход препарирования образцов достаточно эффективен в рутинных исследованиях распределения молекул нуклеиновых кислот по длинам. Представленные авторами результаты совпадали с данными электронной микроскопии (исследовались молекулы двунитевой РНК реовируса), при этом было отмечено, что при равенстве разрешающих способностей важным преимуществом АСМ является существенно менее сложная методика приготовления образцов.

Была продемонстрирована возможность использования модифицированной APTES слюды при проведении исследований как на воздухе, так и в водной среде, — в обоих случаях величина адгезии молекул нуклеиновых кислот к подложке позволяла осуществлять сканирование в контактном режиме. В работе [48] осуществляли сканирование одного и того же участка поверхности с адсорбированными макромолекулами на воздухе и в воде, при этом во втором случае отмечалось увеличение разрешающей способности (примерно в три раза), что может быть связано с исключением негативного влияния капиллярных сил (см. раздел 1.3.1). Капиллярные силы увеличивают силовое воздействие зонда на образец, что вызывает дополнительные деформации макромолекулы, ее разрушение или нестабильность в процессе сканирования, и приводит к уменьшению разрешающей способности.

Другие исследователи также сообщают, что, если АСМ-исследования проводятся либо в сухой газовой атмосфере (иногда для уменьшения относительной влажности температуру рабочей атмосферы повышают до 60–100°C [49]), либо в жидкостной ячейке [50, 51], то влияние капиллярных сил уменьшается, что увеличивает достигаемое пространственное разрешение. Применение режима прерывистого контакта (*tapping mode*, см. раздел 1.3.2) [52, 53] также позволяет исключить влияние капиллярных сил; микроскопия прерывистого контакта позволяет сегодня достичь разрешения (при проведении исследований в жидких средах), необходимого для визуализации витков двойной спирали ДНК [54].

На пути подбора адекватного подхода к приготовлению образцов может оказаться полезным накопленный за десятилетия исследований багаж методик препарирования образцов электронной микроскопии. В упрощенном варианте многие из этих методик могут применяться и для решения задач зондовой микроскопии. Так, модифицированный метод Кляйншмидта [31, 32] (метод белковой пленки, см. раздел 1.4) дает хорошие результаты при использовании гидрофобных подложек [55]. Недостатком метода может служить то, что комплексообразование молекул нуклеиновых кислот с белковой пленкой (часто используют пленку цитохромов С) затрудняет исследование взаимодействия этих молекул с другими белками, что ограничивает круг решаемых задач.

Для фиксации развернутых молекул ДНК на поверхности подложки применяют также бензилдиметилалкиламмоний хлорид (BAC) [56, 57] — широко используемый в электронной микроскопии реагент, представляющий собой катионное поверхностно-активное вещество (ПАВ). BAC в малых концентрациях (около $5 \times 10^{-5}\%$) добавляют непосредственно в раствор, содержащий макромолекулы, перед нанесением препарата на поверхность слюды. Вследствие свойств ПАВ, на поверхности капельки, наносимой на подложку, формируется стабильная пленка молекул BAC (со связанными с ней молекулами ДНК), которая распределяется по поверхности слюды и стабилизируется за счет сил электростатического взаимодействия. Использование других ПАВ (в малых концентрациях) также способствует стабилизации молекул нуклеиновых кислот на поверхности слюды. Так, в работе [58] для разворачивания ДНК на поверхности, успешно применили 2,4,6-трис(диметиламинометил)фенол (DMP-30) и хлорид цетилпиридиния (CP), представляющие собой, соответственно, неионное и катионное ПАВ. На рис. 4.1 (стр. 125) представлен результат АСМ-исследования ДНК бактериофага T4, адсорбированной на поверхность слюды из раствора, содержащего малые концентрации цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ). К недостаткам метода с применением ПАВ можно отнести некоторую поверхностную неоднородность получаемых образцов, что обусловлено неконтролируемостью процессов формирования пленки и комплексообразования с исследуемыми макромолекулами. Удачным дополнением метода может служить использование методики Ленгмюра-Блоджетт: формирование на границе раздела фаз жидкость/газ пленки амфифильных[19)] молекул и последующее контролируемое перенесение ее на поверхность твердой подложки (см. главу 5).

В работе [59] для иммобилизации молекул ДНК применили другую методику, сходную с традиционной для электронной микроскопии. Макромолекулы адсорбировали на поверхность слюды, сверху напыляли слой углерода. После этого на углерод приклеивали стальную пластинку, слюду удаляли, и открытой для сканирования оказывалась внутренняя (обращенная прежде к слюде) поверхность углеродной пленки с жестко закрепленными в ней макромолекулами. Шероховатость поверхности углеродной пленки составляла, по оценкам авторов, единицы

[19)] т.е. состоящих из полярной и гидрофобной части ангстрем и допускала однозначную идентификацию отдельных молекул ДНК. Авторы работы отмечают высокую стабильность приготовленных образцов — макромолекулы не разрушались при больших силах воздействия зонда, результаты не зависели от среды исследования (эксперименты проводились как на воздухе, так и в жидкости), длительное хранение не влияло на качество образцов. Недостаток этого метода состоит в его относительной экспериментальной трудоемкости.

Успехи применения атомно-силовой микроскопии к исследованию молекул нуклеиновых кислот позволили достичь прогресса и при проведении подобных экспериментов методами сканирующей туннельной микроскопии. Хорошие результаты были получены при СТМ-исследовании молекул ДНК, адсорбированных на химически модифицированных поверхностях металлов [60]. Химическая модификация включала ковалентную связь химически поляризуемых групп тиолов с чистой поверхностью металла. Адсорбция ДНК осуществлялась за счет кулоновского взаимодействия молекулы с плотно упакованной мономолекулярной пленкой тиолов, ориентированной положительными функциональными группами к молекуле ДНК. Характерной особенностью представленных в работе [61] изображений молекул ДНК (приготовленных по описываемой методике) является отрицательный контраст (при движении над молекулой туннельная игла опускается ниже, чем при движении над поверхностью подложки), связанный, по-видимому, со слабой проводимость макромолекулы.

Другой перспективный подход к исследованию макромолекул методами СТМ — применение низкотоковой туннельной микроскопии [62] с рабочим диапазоном туннельного тока менее 1 пА. В этом случае экспериментальные результаты [63] свидетельствуют о возможности визуализации молекул ДНК, адсорбированных на поверхности диэлектрической подложки (слюды). Транспорт заряда в системе зонд-образец-подложка осуществляется за счет проводимости ультратонкой пленки воды, покрывающей поверхности образца и подложки при проведении исследований в условиях контролируемой относительной влажности. Оптимальное значение последней для подобных экспериментов составляет 60–65%.

Т.о. спектр применяемых методик препарирования образцов нуклеиновых кислот для СЗМ весьма широк. В то же время стоит отметить, что описанные методики разработаны для исследования *свободных* молекул ДНК, поэтому априори неизвестно адекватны ли они для изучения, например, взаимодействия нуклеиновых кислот с белками или поверхностно-активными веществами. Упомянем также, что в литературе по СЗМ описаны, в основном, лишь исследования двунитевых молекул нуклеиновых кислот: РНК и ДНК, имеющих двойную спираль, и практически отсутствуют данные об исследовании однонитевых молекул (которые сложнее зафиксировать на подложке в расправленном состоянии), см. главу 3.

1.5.2. Применение зондовой микроскопии для исследования структуры и свойств молекул нуклеиновых кислот и их комплексов

При подборе адекватной методики приготовления образцов сканирующий зондовый микроскоп представляет собой удобный и надежный прибор для исследования свойств биологических структур на молекулярном уровне. Убедительным доказательством этого утверждения могут служить результаты работ, посвященных исследованию конформационных свойств молекул нуклеиновых кислот и их комплексов с белками, ПАВ и т.п.

Авторы работы [35] исследовали влияние специфических лигандов (дистамицина и микрогонотропена-6b) на конформационные свойства нескольких типов молекул ДНК методом АСМ прерывистого контакта. Результаты исследований не только обеспечили визуальное доказательство влияния данных лигандов на конформацию ДНК, но и позволили сделать определенные количественные оценки, основанные на анализе представленных авторами гистограмм распределения расстояния между концами ДНК.

В работе [36] исследовали специфическое взаимодействие РНК-полимеразы из *Escherihia coli* с ДНК, содержащей λP_L промотор. Образованные комплексы были визуализированы методом АСМ, на полученных изображениях наблюдались молекулы ДНК с РНК-полимеразой, локализованной на расстоянии $^4/_9$ от одного из концов. Проводили анализ структуры комплекса РНК-полимеразы и ДНК как в открытых комплексах, связанных с промотором (OPCs), так и в стабильных элонгационных комплексах (C15) с образованным 15-нуклеотидным транскриптом. Было показано, что в области прикрепления РНК-полимеразы происходит изгиб молекулы ДНК, причем средний угол изгиба для OPCs и C15 составлял $54 \pm 31^\circ$ и $92 \pm 37^\circ$, соответственно. На основании обнаруженного различия в значениях средних углов изгиба для OPCs и C15 авторы делают вывод, что процесс транскрипции сопровождается изменением структуры комплекса РНК-полимеразы с ДНК, обусловленной конформационными изменениями полимеразы.

Возможность АСМ-визуализации молекулярных процессов продемонстрирована в работе [8] на основе последовательного анализа образования неспецифичных комплексов молекулы ДНК и РНК-полимеразы в реальном масштабе времени. Схема эксперимента включала в себя адсорбцию макромолекул ДНК на слюду из 10 мМ HEPES буфера в присутствии ионов магния (1–10 мМ $MgCl_2$), затем следовали промывка и высушивание образцов в эксикаторе. После этого образцы помещали в жидкостную ячейку микроскопа, начинали процесс сканирования, а затем в раствор вводили РНК-полимеразу. Было показано, что образование комплексов белок-ДНК наблюдается уже через несколько секунд после добавления полимеразы, что свидетельствует о сохранении нативной конформации РНК-полимеразы и ДНК в процессе приготовления образцов и проведения исследований. Эти результаты демонстрируют возможность использования зондовой микроскопии для исследования процессов, ответственных за распознавание и сборку макромолекулярных комплексов в физиологических условиях.

Большое прикладное значение имеет возможность решения методом АСМ задачи *физического картирования* ДНК: специфические участки макромолекулы помечаются определенными маркерами, анализ местоположения этих маркеров на получаемых АСМ-изображениях позволяет составлять карты относительного расположения специфических последовательностей нуклеотидов. Так, в работе [44] продемонстрирована возможность визуализации местоположения биотина, ковалентно привязанного к первому нуклеотиду праймера. Биотин помечался белковым комплексом стрептавидин-стафиллококковый белок A (стрептавидин имеет высокую способность связывания с биотином, а белок A увеличивает размеры маркера для однозначной его идентификации на АСМ-изображениях).

В работах [64, 34] был использован метод картирования клонированных в плазмидный вектор последовательностей LTR (длинные концевые повторы) с помощью специфических маркеров, имеющих характерную форму — R-петель. R-петли формировались последовательностями РНК из 345 и 380 нуклеотидных оснований, комплементарными к U3 и U5 областям LTR человеческого эндогенного ретровируса K-10 (HERV-K10). В процессе образования петли РНК формировала двойную спираль с комплементарным участком ДНК, вытесняя вторую нить ДНК, которая коллапсировала в результате воздействия ионов Mg^{2+}; характерная форма образованной структуры (петля) позволяла уверенной идентифицировать ее на АСМ-изображениях. Различная длина зондов позволяла уже из одной гистограммы определить как положение, так и ориентацию LTR. Полученные результаты позволяют предположить, что в будущем разрешение приборов СЗМ может быть достаточным для определения последовательности нуклеотидов ДНК.

Уникальную возможность зондового микроскопа как прибора, позволяющего проводить прецизионные исследования локальных свойств поверхности, продемонстрировали авторы работы [7]. Они проводили прямые исследования силового взаимодействия, ответственного за формирование витков молекулы ДНК, по следующей схеме.

На поверхностях подложки и кремниевого микрозонда создавали два типа покрытия, представляющего собой слой ковалентно привязанных за один из концов комплементарных олигомеров — в одном случае $(АЦТГ)_5$, в другом $(ЦАГТ)_5$. В процессе взаимодействия пары данных олигонуклеотидов (длиной в 20 нуклеотидов) возможно образование комплексов с 20, 16, 12, 8 и 4 парами взаимодействующих оснований.

В ходе эксперимента многократно измеряли кривую силового взаимодействия $F(z)$ между зондом и подложкой. На основании этих результатов определяли силу адгезии и строили гистограммы ее распределения. В случае отсутствия специфического взаимодействия между комплементарными участками наблюдалось бы однородное гауссово распределение для силы адгезии. Однако на полученных гистограммах четко прослеживались отдельные пики ($1{,}52 \pm 0{,}19$; $1{,}1 \pm 0{,}13$; $0{,}83 \pm 0{,}11$ нН), отображающие, очевидно, специфическое взаимодействие 20, 16 и 12 пар комплементарных оснований (авторы указывают, что комплексы с 8 и 4 взаимодействующими парами оснований термодинамически нестабильны при 27°C — температуре проведения исследований).

Сходную экспериментальную схему — с образованием между взаимодействующими поверхностями «мостиков» в виде отдельных нитей ДНК длиной в 160 оснований — использовали для анализа внутримолекулярных упругих свойств. Таким образом, авторам удалось продемонстрировать возможность применения АСМ для прямого количественного анализа межмолекулярного и внутримолекулярного взаимодействия в комплексах биологических и синтетических макромолекул, что открывает новые перспективы для обнаружения и локализации специфических последовательностей нуклеотидов с ангстремным разрешением.

Глава 2

Анализ искажающих эффектов атомно-силовой микроскопии

Несмотря на возможность достижения высокого пространственного разрешения, информация, получаемая методами зондовой микроскопии (в частности — АСМ), может неадекватно отображать реальные особенности поверхности, что является следствием влияния инструмента исследования на объект и приводит к наблюдению *артефактов*. Эти артефакты, как правило, легко учитываются на качественном уровне при интерпретации АСМ-результатов, однако специфика ряда задач может потребовать количественных оценок и методов восстановления реальной геометрии объектов.

Мы проанализировали два основных артефакта АСМ, влияние которых существенно при проведении исследований *отдельных* микрообъектов, адсорбированных на поверхность твердой подложки: эффекта *уширения профиля* и эффекта *занижения высот* АСМ-изображения объектов исследования. Построили количественные методики учета влияния рассматриваемых эффектов на результаты исследования АСМ. В свете результатов *теории контактных деформаций* возникла необходимость пересмотреть механизм визуализации атомной (или молекулярной) структуры поверхности при исследованиях АСМ.

2.1. Контактные деформации зонда и образца

С первых работ по АСМ-визуализации молекул нуклеиновых кислот [6, 41] отмечалось, что высоты АСМ-изображений ДНК существенно занижены в сравнении с модельными представлениями о структуре молекулы. В то же время, для ряда других объектов (с близкими физическими свойствами, но отличными геометрическими размерами) эффект занижения высот проявляется не столь выраженно. Так, в главе 3 изложены результаты исследования вирусных частиц табачной мозаики и вирусной РНК. Было обнаружено (см. раздел 3.1, стр. 95 и далее), что эффект занижения высот для вирусных частиц несущественен (при минимизации силы воздействия зонда), в то время, как высота АСМ-изображений молекул нуклеиновых кислот в тех же условиях эксперимента занижена более чем на 50%, несмотря на то, что и те и другие объекты визуализированы на одном кадре. Применение излагаемой ниже методики позволило объяснить данную закономерность и связать ее с различием радиусов частиц ВТМ (~ 10 нм) и нуклеиновых кислот (≤ 1 нм).

Следуя [65] мы предположили, что эффект занижения высот АСМ-изображений объектов связан с контактными деформациями. Действительно, в процессе сканирования, как в режиме контакта, так и прерывистого контакта, зонд воздействует на образец с некоторой силой (см. раздел 1.3, стр. 18 и далее), величина которой обычно лежит в диапазоне $(1 \div 100) \times 10^{-9}$ Н. Действие этой силы, в связи с чрезвычайно малым радиусом кривизны зондирующего острия (обычно около 10 нм), приводит к возникновению значительного *контактного* давления, которое должно вызывать контактные деформации.

2.1.1. Контакт двух тел: решение контактной задачи Герца

Впервые задача о контактных деформациях двух тел была рассмотрена Г. Герцем в 1882 г. [66]. Остановимся на основных соотношениях решения *контактной задачи Герца* [67]. Рассмотрим два тела, которые соприкасаются друг с другом в некоторой точке их поверхностей, см. рис. 2.1 а, на рисунке изображен разрез соприкасающихся поверхностей, O — точка контакта.

Вблизи точки касания O уравнения поверхностей могут быть записаны в виде:

$$\begin{aligned} z &= \chi_{\alpha\beta} x_\alpha x_\beta, \\ z' &= \chi'_{\alpha\beta} x'_\alpha x'_\beta, \end{aligned} \tag{2.1}$$

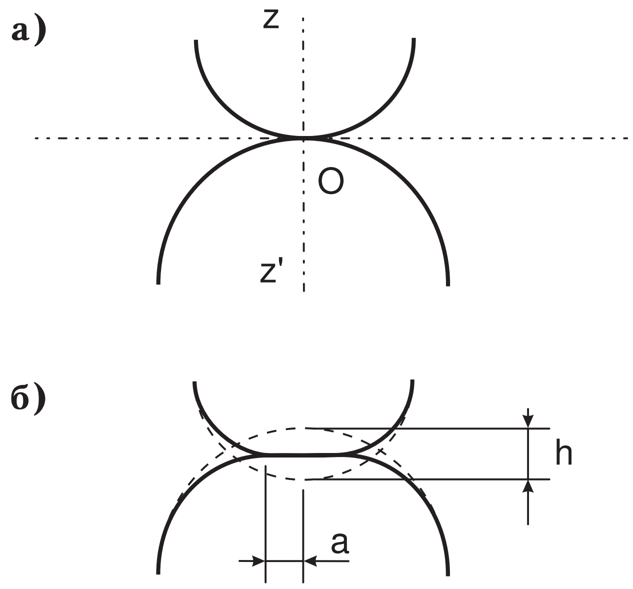


Рис. 2.1. Контакт двух тел, деформации;

а) — соприкосновение контактирующих поверхностей; б) — деформации при наложении сближающей силы, h — сближение за счет деформации, a — латеральный размер контактной площадки

где по дважды повторяющимся индексам α и β — суммирование. Тензоры $\chi_{\alpha\beta}$ и $\chi'_{\alpha\beta}$ характеризуют кривизну поверхностей, их главные значения равны $1/R_1$, $1/R_2$ и $1/R'_1$, $1/R'_2$, где R_1, R_2, R'_1, R'_2 — главные радиусы кривизны контактирующих поверхностей в точке O.

Если теперь эти два тела сдавливаются некоторой силой F, то они будут деформироваться и сблизятся на некоторое расстояние h (рис. 2.1 б), при этом областью соприкосновения будет уже не одна точка, а некоторый участок конечной площади S.

Дальнейший анализ, проведенный Герцем, включает рассмотрение тензора $\chi_{\alpha\beta} + \chi'_{\alpha\beta}$, главные значения которого A и B могут быть выражены через R_1, R_2, R'_1, R'_2, соответствующие формулы для общего случая приведены в [67]:

$$2(A+B) = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \frac{1}{R_1'} + \frac{1}{R_2'},$$

$$4(A-B)^2 = \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right)^2 + \left(\frac{1}{R_1'} - \frac{1}{R_2'}\right)^2 + \tag{2.2}$$

$$+ 2\cos 2\varphi \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2}\right)\left(\frac{1}{R_1'} - \frac{1}{R_2'}\right),$$

где φ — угол между теми нормальными сечениями поверхностей, в которых радиусы кривизны — R_1 и R_1'. (Знаки радиусов кривизны положительны для выпуклых тел и отрицательны — для вогнутых).

Известные соотношения Герца показывают, что формой области контакта является эллипс с полуосями a и b, причем (при условии малости деформаций в сравнении с соответствующими радиусами кривизны):

$$h = \frac{FD}{\pi} \int_0^\infty \frac{d\xi}{\sqrt{(a^2+\xi)(b^2+\xi)\xi}},$$

$$A = \frac{FD}{\pi} \int_0^\infty \frac{d\xi}{(a^2+\xi)\sqrt{(a^2+\xi)(b^2+\xi)\xi}}, \tag{2.3}$$

$$B = \frac{FD}{\pi} \int_0^\infty \frac{d\xi}{(b^2+\xi)\sqrt{(a^2+\xi)(b^2+\xi)\xi}},$$

где

$$D = \frac{3}{4}\left(\frac{1-\sigma^2}{E} + \frac{1-\sigma'^2}{E'}\right), \tag{2.4}$$

здесь E, E', σ и σ' модули Юнга и Пуассона материалов зонда и образца. Главные значения суммарного тензора кривизны — A и B выражаются через величины вида $1/R$, и имеют размерность обратной длины — [см$^{-1}$], а параметр D, определяемый через величины вида $1/E$, имеет размерность обратного давления [Па$^{-1}$] и может рассматриваться как величина, обратно пропорциональная некоторому эффективному модулю Юнга области контакта.

Воспроизведем, также, формулу, описывающую распределения давления в области контакта:

$$P_z(x,y) = \frac{3F}{2\pi ab}\sqrt{1 - \frac{x^2}{a^2} - \frac{y^2}{b^2}}. \tag{2.5}$$

Соотношения Герца (2.3) связывают искомые параметры задачи (полуоси a, b эллиптической области контакта и величину сближения h) с известными параметрами (сдавливающей силой F, модулями Юнга зонда и образца, параметрами A и B) через интегральные зависимости, сводимые к эллиптическим интегралам. Однако в силу того, что (2.3) являются системой нелинейных уравнений с неявными зависимостями от искомых параметров a и b, то, для возможности их применения при интерпретации экспериментальных результатов, необходимы либо реализация общего численного решения, либо дополнительный анализ с привлечением упрощающих предпосылок.

2.1.2. Контакт сферического зонда и сферического (или плоского) образца

Известно, что соотношения Герца (2.3) легко упрощаются в случае, когда контактирующие тела имеют сферическую геометрию (рассмотрение этого случая входит в стандартный курс теории упругости, см. например [67]).

Такая модель геометрии контакта может найти широкое применение в задачах, связанных с интерпретацией результатов СЗМ — при рассмотрении контактных деформаций, возникающих в процессе сканирования микрообъектов, форма которых может быть аппроксимирована сферой[1)], а также плоских образцов, например, тонких пленок.

Воспроизведем известные формулы и проведем оценки. Если зонд и образец вблизи точки контакта описываются сферическими поверхностями и характеризуются радиусами кривизны R и R', то, согласно (2.2),

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

откуда $a = b$, и, из соотношений (2.3), следует, что область контакта будет представлять собой окружность радиуса a:

$$a = (FD)^{1/3}\left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'}\right)^{-1/3}, \tag{2.6}$$

здесь D также описывается (2.4).

[1)] например, молекул ряда белков и пр.

Модуль упругости образца, Па	a, нм — радиус области контакта		h, нм — сближение за счет деформации		P, ГПа — контактное давление	
10^8	7,2	16	5,2	24	0,03	0,07
10^9	3,4	7,2	1,1	5,2	0,14	0,3
10^{10}	1,6	3,4	0,25	1,1	0,63	1,4
10^{11}	0,9	1,8	0,07	0,3	2,2	4,7
10^{12}	0,7	1,4	0,04	0,2	3,7	7,9
при величине сближающей силы (нН):						
	5	50	5	50	5	50

Таблица 2.1. Сравнительный анализ контактных деформаций, возникающих при АСМ-исследовании материалов с различными упругими свойствами.

Оценки по формулам (2.6), (2.7) и (2.8) для контактирующего с плоским образцом кремниевого зонда ($E = 1{,}5 \times 10^{11}$ Па) радиусом кривизны кончика $R = 10$ нм при двух значениях сдавливающей силы: $F = 5 \times 10^{-9}$ Н и $F = 5 \times 10^{-8}$ Н

Для величины h — сближения зонда и образца за счет контактных деформаций — в этом случае справедлива формула:

$$h = (FD)^{2/3} \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)^{1/3}. \tag{2.7}$$

В этих формулах, как и ранее, F — сила, сдавливающая зонд и образец.

И приведем формулу для вычисления давления на образец:

$$P = \frac{F}{S} = \frac{1}{\pi} \left(\frac{F}{D^2} \right)^{1/3} \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'} \right)^{2/3}. \tag{2.8}$$

Рассмотрим контакт кремниевого зонда ($E = 1{,}5 \times 10^{11}$ Па) радиусом кривизны $R = 10$ нм (типичное значение, см. таблицу А.1) с плоским образцом, и проведем оценки для двух значений величины сдавливающей силы: $F = 5 \times 10^{-9}$ Н и $F = 5 \times 10^{-8}$ Н (таблица 2.1).

Таблица перекрывает диапазон значений модулей упругости образцов от 10^8 Па (значение модуля упругости пенопласта) до 10^{12} Па (значение модуля упругости алмаза). Для многих материалов значения модуля Юнга лежат в диапазоне $10^{10} \div 10^{11}$ Па; для биополимеров — как правило, в диапазоне $10^9 \div 10^{10}$ Па. Один из существенных выводов анализа таблицы тот, что величина контактного давления составляет значительную величину. Из анализа таблицы можно предположить, например, что АСМ-исследования очень твердых материалов (типа алмаза) при использовании обычных кремниевых зондов могут приводить к разрушению последних (предел прочности кремния: $\sigma_{в} = 0{,}7 \times 10^9$ Па), если не уделять внимание минимизации силы взаимодействия зонда и образца.

Тот результат, что для более жестких образцов выше значение контактного давления при АСМ-исследованиях, служит объяснением следующей экспериментально наблюдаемой закономерности. Поверхность *слюды* можно локально разрушить при сканировании участка небольшой площади ($100 \times 100\,\text{нм}^2$), если увеличить силу воздействия зонда до величины $\sim 10^{-7}$ нН. В то же время, в тождественных условиях эксперимента поверхность *пирографита* разрушить не удается. Это объясняется меньшим значением контактного давления во втором случае в силу меньшей жесткости пирографита[2)].

С другой стороны, согласно таблице 2.1, типичные значения контактного давления в АСМ-эксперименте часто превышают пределы прочности[3)] исследуемых образцов и при меньших силах воздействия зонда.

В чем же тогда причина возможности проведения методом АСМ неразрушающих исследований широкого спектра материалов?

Возможность проведения неразрушающих исследований с помощью АСМ

Мы предлагаем следующие аргументы, объясняющие возможность проведения неразрушающих исследований методом АСМ:

- Вблизи области контакта имеет место перераспределение *локально* приложенного контактного давления по трем пространственным направлениям.

- При *неразрушающих исследованиях* время воздействия зонда на локальный участок поверхности образца мало в сравнении с характерными временами процессов разрушения поверхности.

Действительно, во-первых, значения пределов прочности определяют приложением разрушающего давления к некоторой поверхности образца в заданном направлении (одном). В нашем случае мы имеем дело

[2)] значение микротвердости пирографита $H_\mu \sim 10^{10}$ Па, слюды $H_\mu \sim 2 \times 10^{11}$ Па

[3)] пределы прочности (по сжатию) слюды и графита составляют $\sigma_{в.сж} \simeq 0{,}5 \times 10^9$ Па и $\sigma_{в.сж} \simeq 0{,}03 \times 10^9$ Па соответственно [68] с приложением к образцу *локального* давления, которое перераспределяется по трем направлениям.

Во-вторых, при сканировании зонд оказывает воздействие на локальный участок образца в течение промежутка времени $\tau \sim a/V_{скан} \sim a/Lf$, где a — латеральный размер области контакта (2.6), L — длина *скана* (строки сканирования), f — частота строчной развертки, $V_{скан}$ — скорость сканирования. Приведем оценку границ диапазона характерного времени взаимодействия. Согласно таблице 2.1, типичные значения $a \sim 1$ нм. Для частоты сканирования 10 Гц при размере кадра 15 мкм имеем для времени взаимодействия оценку $\tau \sim 10^{-5}$ сек, а при размере кадра 100 нм — $\tau \sim 10^{-3}$ сек. Полученные оценки и определяют границы диапазона типичных значений времен взаимодействия зонда и локального участка образца при сканировании.

Поскольку мы экспериментально обнаружили, что, в результате замедления скорости сканирования (увеличения τ от значения 10^{-5} сек до 10^{-3} сек при достаточной величине силы воздействия зонда), ряд исследуемых поверхностей может разрушаться, то можно предположить, что характерные времена процессов разрушения этих поверхностей под локальным воздействием зонда попадают в указанный диапазон.

Эффект разрушения исследуемых поверхностей при замедлении скорости сканирования. Замедление скорости сканирования (при фиксированной величине воздействующей силы) может приводить к разрушению исследуемой поверхности. Например, уменьшение размера кадра (при той же частоте строчной развертки[4)]) приводит к уменьшению скорости сканирования (перемещения зонда по поверхности) и может вызывать разрушение поверхности, успешно сканируемой при больших размерах кадра при том же значении силы воздействия зонда.

На этом принципе основана апробированная нами методика формирования в тонких органических пленках искусственных дефектов: участок поверхности заданной площади сканировали при медленной скорости, что приводило к локальному разрушению пленки зондом и удалению ее материала с этого участка; затем, при сканировании кадра большего размера (при увеличенной скорости сканирования), визуали-

[4)] значение частоты строчной развертки ограничено сверху скоростью оцифровки данных зировали искусственный дефект в пленке, размеры и форма которого совпадали с участком предварительного сканирования (см. рис. 5.10). С другой стороны, стоит отметить, что именно разрушение поверхности при уменьшении размера кадра (замедлении скорости перемещения зонда по поверхности) являлось *основным препятствием* при исследованиях молекулярной упаковки тонких пленок, см. раздел 5.3.

Можно было бы предположить, что механизм эффекта следующий. При большой скорости сканирования объект (например, тонкая пленка) не «успевает» деформироваться и эффективная глубина проникновения зонда меньше, чем определяемая формулой (2.7). При замедлении скорости перемещения зонд глубже «вдавливается» в образец и, если глубина проникновения h становиться сравнимой с толщиной пленки, то имеет место разрушение.

Однако, по-видимому, это объяснение не может быть принято как универсальное. Действительно, согласно оценкам раздела 2.1.4 (см. со стр. 71), характерное время установления упругих контактных деформаций составляет величину $\sim\ 10^{-6}$ сек, что меньше или много меньше, чем время взаимодействия зонда и локального участка образца ($10^{-3} \div 10^{-5}$ сек, см. выше). Поэтому применение статических формул теории контактных деформаций (типа (2.7)) для анализа результатов АСМ является оправданным, в силу чего глубину проникновения зонда в образец за счет упругих деформаций следует считать не зависящей от скорости сканирования. Т.о. проводимые в разделе 2.1.4 оценки позволяют сделать вывод, что наблюдаемый эффект: разрушения поверхности при *замедлении скорости сканирования* не связан с динамикой процесса упругих деформаций и должен быть обусловлен более медленными, *неупругими* процессами. Т.е. разрушение поверхности имеет место в случае, когда характерное время взаимодействия зонда и локального участка образца становиться сравнимым со временами неупругих процессов, связанных с локальным воздействием зонда (при достаточной величине силы воздействия).

2.1.3. Контакт сферического зонда и цилиндрического образца

Модель цилиндрического образца может найти применение при анализе деформаций микрочастиц цилиндрической формы (вирусных частиц, линейных макромолекул и пр.). Однако в этом случае (контакт сферического зонда с боковой поверхностью цилиндра) соотношения Герца (2.3) не упрощаются[5]. Поэтому мы реализовали общее численное решение системы (2.3), а также проанализировали два частных случая (близких и различающихся главных значений суммарного тензора кривизны контактирующих поверхностей), для которых удалось получить аналитические формулы, выражающие искомые величины явно через известные параметры задачи. Из формул (2.3) следует:

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

$$A = -\frac{1}{a}\frac{\partial h}{\partial a}, \tag{2.9}$$

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

где $K(k)$ — полный эллиптический интеграл. Соотношения (2.9) являются просто другой формой записи соотношений (2.3).

Численное решение задачи о контактных деформациях сферического зонда и цилиндрического образца

Соотношения (2.3) являются системой нелинейных уравнений, где искомые величины выражены неявно через эллиптические интегралы. Это обстоятельство осложняет реализацию численного решения, основанного непосредственно на (2.3). Поэтому мы провели дополнительные аналитические преобразования, основываясь на соотношениях (2.9).

Воспользовавшись формулой [69]:

$$\frac{\partial K(k)}{\partial k} = \frac{1}{k}\left(\frac{E(k)}{k'^2} - K(k)\right),$$

---

[5] анализ данной геометрии не встречался нам ни в стандартном курсе теории упругости [67], ни в литературе по АСМ, поэтому мы сочли возможным изложить выкладки, проведенные нами для рассматриваемого случая

где $E(k)$ — полный эллиптический интеграл, $k' = \sqrt{1-k^2}$, вычисляя производные в соотношениях (2.9), получим:

$$\frac{b^2}{a^2} = \frac{A}{B}\frac{K}{E} - \frac{A}{B} + \frac{K}{E}, \qquad (2.10)$$

где $K = K\left(\sqrt{1-a^2/b^2}\right)$, $E = E\left(\sqrt{1-a^2/b^2}\right)$.

Соотношение (2.10) является нелинейным уравнением с одним неизвестным — отношением a/b, что позволяет реализовать его решение. Далее, из (2.9) получаем зависимость:

$$b^3 = \frac{2FD}{\pi B}\left(1-\frac{a^2}{b^2}\right)^{-1}\left(K\left(\sqrt{1-a^2/b^2}\right) - E\left(\sqrt{1-a^2/b^2}\right)\right), \qquad (2.11)$$

которая позволяет определить b по известному отношению a/b.

Таким образом мы свели систему нелинейных уравнений к независимым уравнениям: из соотношения (2.10) можно численно[6)] определить a/b, затем, из соотношения (2.11), значение b. Воспользовавшись первым из уравнений (2.9) определяем h. Так получаем все искомые параметры: h, a и b, т.е. задача решена численно в общем виде без использования упрощающих предположений. После этого давление (среднее) в области контакта также можно определить: $P = F/\pi ab$. Текст программы[7)], реализующей данное численное решение, приведен в «Приложении» на стр. 220.

Реализованное решение справедливо для произвольной геометрии зонда и образца[8)]. Необходимые для решения значения A и B определяются именно этой геометрией: для случая контакта сферы радиуса R и боковой поверхности цилиндра радиуса R' они выражаются из соотношений (2.2) следующим образом:

$$A = \frac{1}{2}\left(\frac{1}{R} + \frac{1}{R'}\right), \qquad B = \frac{1}{2R}. \qquad (2.12)$$

Рассмотрим теперь дополнительные упрощающие предположения частных случаев.

6) мы реализовали метод простых иттераций [70]

7) написанной на языке `C++`

8) если их поверхности описываются ненулевыми главными радиусами кривизны

Случай различающихся главных значений суммарного тензора кривизны контактирующих поверхностей. В случае контакта зонда и боковой поверхности цилиндра, при условии, что радиус цилиндра меньше радиуса зонда, из формулы (2.12) следует, что главные значения суммарного тензора кривизны поверхностей различаются: $A > B$. Из формулы (2.10) (или непосредственно из формул (2.3)) следует, что в этом случае $a < b$. Если различие составляет достаточную величину, то можно воспользоваться асимптотикой полного эллиптического интеграла, справедливой при условии $a^2 \ll b^2$, что, очевидно, не является жестким условием [69]:

$$K(k) = \ln\left(\frac{4}{k'}\right) + \frac{1^2}{2^2}\left(\ln\frac{4}{k'} - \frac{2}{1\cdot 2}\right)k'^2 + \ldots, \tag{2.13}$$

где $k' = \sqrt{1-k^2}$. В асимптотике (2.13) ограничимся первым членом и получим:

$$h = (C+1)\,\frac{2FD}{\pi b}, \tag{2.14}$$

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

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

Воспользовавшись уравнениями (2.12, 2.13), можно показать, что имеет место соотношение:

$$C = \ln\left(\frac{4b}{a}\right) - 1 = \frac{Bb^2}{Aa^2}. \tag{2.15}$$

Из уравнения (2.15) при известном отношении B/A можно численно определить отношение b/a и, соответственно, значение безразмерного параметра C. Численное решение показывает, что значение C для многих задач лежит в диапазоне от 1 до 3 и, в частности, при анализе контакта зонда ($R = 10$ нм) и молекулы нуклеиновой кислоты ($R' = 1$ нм) с достаточной точностью можно воспользоваться соотношением $C \simeq 2$.

Формулы для параметров эллиптической области контакта a и b несколько громоздки:

$$\begin{aligned} a &= \left(\frac{4}{\pi^2 C}\right)^{1/6} \times (FD)^{1/3} \times \left(\frac{B}{A^3}\right)^{1/6} \\ b &= \left(\frac{2C}{\pi}\right)^{1/3} \times (FD)^{1/3} \times \left(\frac{1}{B}\right)^{1/3}, \end{aligned} \tag{2.16}$$

но по своей структуре совпадают с уравнением (2.6) для известного случая сферического образца (что естественно), отличие лишь в числовых множителях и в характере зависимости от соответствующих радиусов кривизны. Подставляя второе из уравнений (2.16) в (2.14), получим для h:

$$h = \left(\frac{4}{\pi^2 C}\right)^{1/3} (C+1) \times (FD)^{2/3} \times B^{1/3}, \tag{2.17}$$

что также по структуре совпадает с формулой (2.7) для сферического случая. Получим выражение для давления на образец на основании (2.13) и (2.12):

$$P = \frac{F}{\pi ab} = \left(\frac{1}{16\pi^2 C}\right)^{1/6} \times \left(\frac{F}{D^2}\right)^{1/3} \times (A^3 B)^{1/6}, \tag{2.18}$$

структура которого также совпадает с формулой (2.8), справедливой для сферического образца.

Таким образом, полученные нами формулы (2.17), (2.16) и (2.18) решают поставленную задачу. Действительно, искомые параметры выражены явно через известные величины (F, D, A, B) и параметр C, который можно определить из соотношения (2.15) или воспользоваться оценкой.

Для удобства сравнения результатов точного решения (по соотношениям (2.10), (2.11) и первым из (2.9)) и приближенного (по (2.17), (2.16) и (2.18)), последнее также включено в программу решения задачи о контактных деформациях, текст которой приведен на стр. 220.

Случай близких главных значений суммарного тензора кривизны контактирующих поверхностей. Случай близких значений величин A и B реализуется для задачи контакта сферического зонда и боковой поверхности цилиндра при условии, что радиус цилиндра много больше радиуса зонда. Тогда, в силу соотношений (2.12), действительно $A \sim B$ и, в силу (2.10) (или непосредственно (2.3)), имеем: $a \sim b$. В этом случае асимптотика (2.13) теряет применимость.

При выполнении условия $a \sim b$ следует воспользоваться другой асимптотикой полного эллиптического интеграла [69]:

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

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

В этом случае для параметров области контакта a и b с привлечением соотношений (2.12) и (2.9) можно вывести следующие зависимости:

$$\frac{aA}{bB} = 1,$$
$$a = \left[2FD\left(\frac{1}{A}+\frac{1}{B}\right)\right]^{1/3}\left(1+\frac{A}{B}\right)^{-1}, \tag{2.19}$$

откуда:

$$a = 2^{1/3}(FD)^{1/3} \times \left(\frac{1}{A}+\frac{1}{B}\right)^{1/3}\left(1+\frac{A}{B}\right)^{-1}$$
$$b = 2^{1/3}(FD)^{1/3} \times \left(\frac{1}{A}+\frac{1}{B}\right)^{1/3}\left(1+\frac{B}{A}\right)^{-1}, \tag{2.20}$$

что совпадает по структуре с (2.6) и (2.16) и позволяет найти a и b по известным параметрам задачи.

Для сближения зонда и образца за счет деформации получим:

$$h = (FD)^{2/3} \times \left(\frac{1}{4A}+\frac{1}{4B}\right)^{-1/3}, \tag{2.21}$$

что также имеет структуру, сходную с уравнениями (2.7) и (2.17).

И для величины давления на образец имеем выражение:

$$P = \frac{F}{\pi ab} = \frac{4}{\pi}\left(\frac{F}{D^2}\right)^{1/3} \times AB\left(\frac{1}{4A}+\frac{1}{4B}\right)^{4/3} \tag{2.22}$$

которое по структуре совпадает с (2.8) и с (2.18).

Итак, и для рассматриваемого случая нами получены аналитические формулы (2.21, 2.20), решающие задачу. Для удобства сравнительного анализа с точным численным решением мы также добавили приведенный выше алгоритм в текст программы решения задачи о контактных деформациях (текст программы см. на стр. 220).

Контактные деформации зонд-образец-подложка

Выше мы рассмотрели контактные деформации в области соприкосновения зонда и образца. Однако общая деформация, определяющая занижение высоты АСМ-профиля, включает еще и вклад деформаций в области контакта образца и подложки (имеется в виду случай, когда сверху на образец давит зонд). Для этого случая остаются справедливыми приведенные выше решения, нужно лишь соответствующим образом переопределить параметры A и B.

Геометрия контакта образца радиуса R' (на который сверху давит зонд радиуса R)[9] и плоской подложки позволяет определить значения A и B по формулам (2.2):

$$A = \frac{1}{2R'},$$
$$B = \frac{1}{2}\left(\frac{1}{R + 2R'}\right). \tag{2.23}$$

Алгоритм анализа этого случая идейно не отличается от проведенного выше для значений A и B, определяемых формулой (2.12), его результаты вошли в таблицу 2.2.

Вообще, вклад в формулу для занижения высот АСМ-профиля объектов исследования за счет контактных деформаций при сканировании дают три слагаемых:

$$\Delta h_{\textit{сум}} = \Delta h_{\textit{зонд/образец}} + \Delta h_{\textit{образец/подложка}} - \Delta h_{\textit{зонд/подложка}}, \tag{2.24}$$

где второе слагаемое фактически совпадает с первым в случае малых радиусов цилиндра. Что касается третьего слагаемого, то оно определяется формулой (2.7) (типичные значения приведены в таблице 2.1), и при анализе результатов исследования «мягких» биообъектов, адсорбированных на «твердых» подложках, им можно пренебречь в сравнении с первыми двумя.

Однако при анализе случая «мягкой» подложки третье слагаемое формулы (2.24) следует учитывать. Так, из таблиц 2.1 и 2.2 следует, что занижение высот цилиндрического образца (радиус 1 нм, модуль Юнга 10^{10} Па, сила воздействия зонда 5 нН) в случае слюдяной подложки ($E \sim 10^{11}$ Па) будет в $\sim$1,4 раза *больше*, чем в случае пирографитовой ($E \sim 10^{10}$ Па) подложки. Этот вывод согласуется с экспериментом: действительно, при использовании в качестве подложки слюды занижение высот АСМ-изображений молекул *нуклеиновых кислот* больше, чем при использовании пирографитовой подложки.

[9] образец следует рассматривать в этом случае как изогнутый цилиндр с радиусом изгиба поверхности, контактирующей с подложкой: $R + 2R'$

Применение разработанного алгоритма к сравнительному анализу деформаций образцов с различными значениями радиусов

В качестве иллюстрации мы применили разработанный алгоритм для вычисления контактных деформаций в модельных случаях цилиндрического образца с радиусом 1 нм и радиусом 10 нм и сферического образца с теми же значениями радиуса. Результаты приведены в таблице 2.2, где для удобства сравнительного анализа для всех случаев используются одинаковые параметры: значения модулей Юнга образцов ($E'_1 = E'_2 = 10^{10}$ Па), зонда ($E = 10^{11}$ Па), силы воздействия зонда $F = 5 \times 10^{-9}$ Н и радиуса кривизны кончика зонда $R = 10$ нм. Выбор значений модулей Юнга образов (10 ГПа) обусловлен тем, что это значение является верхней границей модулей упругости *биополимеров*. Поэтому значения, приведенные в таблице, должны рассматриваться в смысле «как минимум» при АСМ-исследованиях биообъектов; в таком случае из анализа таблицы следует вывод, что роль контактных деформаций весьма значительна и должна учитываться при интерпретации результатов подобных экспериментов.

В таблице для цилиндрического образца приведены результаты численных расчетов точной методики, реализованной по соотношениям (2.9), (2.10) и (2.11). Расчеты по приближенным методикам дают незначительные различия с точным решением: для случая $R' = 1$ нм решение по формулам (2.17), (2.16) дает отличие в значениях a и b около 2%, и в значении h — 0,5%; для случая $R' = 10$ нм решение по формулам (2.21), (2.20) дает отличие от точного решения для a и b около 10%, для h около1%.

Из таблицы следует, что при прочих равных условиях относительные деформации объектов с меньшим радиусом кривизны существенно выше. Это подтверждается экспериментом: *относительные* деформации молекул нуклеиновых кислот (радиус кривизны около 1 нм) превышают *относительные* деформации вирусных частиц табачной мозаики, даже в том случае, когда объекты визуализованы на одном кадре[10)].

[10)] что определяет абсолютную тождественность условий эксперимента

R', нм	Область контакта	a и b, нм	P, Па	h, нм	ε, %
сферический образец					
1 нм	зонд/образец	0,7 нм	3×10^9 Па	0,57 нм	29%
	образец/подложка	0,7 нм	3×10^9 Па	0,55 нм	28%
			суммарная деформация:	1,12 нм	56%
10 нм	зонд/образец	1,3 нм	1×10^9 Па	0,32 нм	1,6%
	образец/подложка	1,6 нм	$0,6 \times 10^9$ Па	0,26 нм	1,3%
			суммарная деформация:	0,58 нм	2,9%
цилиндрический образец					
1 нм	зонд/образец	0,46 и 2,2 нм	$1,6 \times 10^9$ Па	0,36 нм	18%
	образец/подложка	0,47 и 2,4 нм	$1,5 \times 10^9$ Па	0,34 нм	17%
			суммарная деформация:	0,7 нм	35%
10 нм	зонд/образец	1,1 и 1,8 нм	$0,8 \times 10^9$ Па	0,29 нм	1,4%
	образец/подложка	1,3 и 2,7 нм	$0,4 \times 10^9$ Па	0,21 нм	1%
			суммарная деформация:	0,5 нм	2,5%

Таблица 2.2. Сравнительный анализ контактных деформаций для моделей сферического и цилиндрического образцов различного радиуса.

Рассматривали два значения радиуса образца: 1 и 10 нм. Во всех случаях использованы одни и те же параметры задачи: значения модулей Юнга образцов ($E_1' = E_2' = 10^{10}$ Па) и зонда ($E = 10^{11}$ Па), величины сжимающей силы $F = 5 \times 10^{-9}$ Н и радиуса кривизны кончика зонда $R = 10$ нм.

В столбцах таблицы указаны:

R' — радиус образца

a и b — параметры области контакта

P — контактное давление

h — величина сближения за счет деформации

ε — относительная деформация ($h/2R' \times 100\%$)

Сравнение с экспериментальными данными

Итак, применив теорию контактных деформаций, мы объяснили основные закономерности эффекта занижения высот АСМ-изображений при проведении АСМ-исследований.

Мы показали также, что зависимость величины деформации от параметров задачи имеет в общем случае (см. формулы (2.7), (2.17) и (2.21)) вид:

$$h \sim (FD)^{2/3} \times f(R, R'), \tag{2.25}$$

где $f(R)$ — некоторая функция радиусов кривизны зонда и образца (размерности $[1/\text{см}^{1/3}]$), F — сила воздействия зонда на образец (поддерживаемая в процессе сканирования системой обратной связи на заданном уровне).

С целью экспериментальной проверки закона $h \sim F^{2/3}$ мы провели исследования тест-объектов — вирусных частиц табачной мозаики и молекул ДНК (имеющих *цилиндрическую форму*) — при различных значениях нагружающей силы при сканировании.

Для вирусных частиц табачной мозаики наблюдалось хорошее совпадение эксперимента с теорией (т.е. с законом «две третьих» (2.25)), см. рис. 2.2

Экспериментальную зависимость измеряли путем анализа высот АСМ-изображений вирусных частиц, полученных при различной величине силы воздействия зонда при сканировании (на графике обозначены среднеквадратичные ошибки средних арифметических, определенные по результатам усреднения измеряемых значений высот для нескольких АСМ-изображений частиц[11)]). Теоретическая зависимость рассчитана по разработанной выше методике (точное решение), где использовались значения радиуса зонда $R = 25$ нм (значение определено из эксперимента для конкретного зонда) и модуля упругости объекта $E' = 4 \times 10^9$ Па (значение определено аппроксимацией экспериментальных точек).

Это позволяет предложить методику измерения модуля упругости *отдельного микрообъекта*, адсорбированного на поверхность твердой подложки. Для этого необходимо измерить высоту АСМ-профиля объекта при различных значениях силы воздействия зонда при сканировании, а затем, из аппроксимирующей зависимости (закона «две третьих»),

[11)] для каждого значения силы анализировалось 30 частиц ВТМ

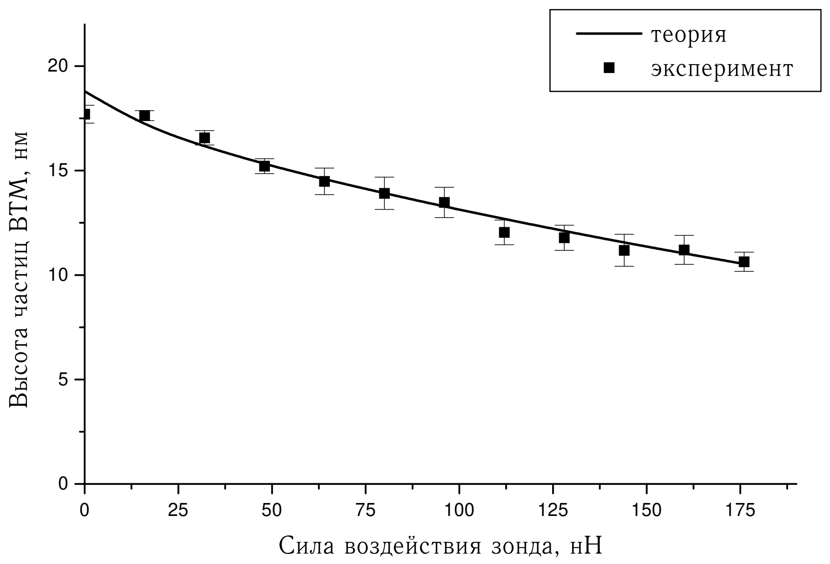


Рис. 2.2. Экспериментальная и теоретическая зависимости деформации частиц вируса табачной мозаики от величины нагружающей силы воздействия зонда при сканировании

определить искомое значение D (связанное с модулем упругости объекта по (2.4)). Мы использовали эту процедуру для определения модуля Юнга отдельных частиц ВТМ и получили, что найденные значения лежат в диапазоне $3 \div 4 \times 10^9$ Па. Эта методика определения упругих параметров адсорбированных объектов может успешно применяться в случае, если относительные деформации объектов невелики (иначе теряет применимость теория контактных деформаций). Погрешности методики связаны с погрешностью калибровки сканера[12)], погрешностью определения параметра геометрии иглы (R)[13)], определения уровня «нулевого» изгиба кантилевера (минимального воздействия зонда) и погрешностью определения жесткости кантилевера фирмой-производителем[14)] (что приводит к погрешностям в определении значений силы воздействия зонда). Однако потенциально жесткость кантилевера можно определять с большей точностью, используя калибровку по резонансной частоте коле-

[12)] мы оцениваем точность калибровки на уровне 5–7%

[13)] как показывает анализ, решение относительно устойчиво к вариации этого параметра

[14)] может составлять более 10%

баний. Это может повысить точность определения упругих параметров отдельных микрообъектов до уровня, определяемого величиной набранной статистики высот объектов и дисперсией этих значений.

Из рис. 2.2 следует, что закон «две третьих» (2.25) справедлив для исследуемого случая в широком диапазоне сил, за исключением области минимальных воздействий. Это связано со следующим: за нулевое значение в эксперименте выбирали минимально возможное значение нагружающей силы, при котором удавалось осуществлять сканирование. Однако в силу того, что эксперимент проводили в естественной атмосфере, наличие капиллярных сил (капиллярного мостика), очевидно, не позволяло минимизировать силу воздействия до величины, меньшей, чем несколько наноньютонов.

Для анализа контактных деформаций молекул нуклеиновых кислот проводили сходный эксперимент, соответствующая экспериментальная зависимость изображена на рис. 2.3. Ошибки экспериментальной кривой также введены как среднеквадратичные ошибки средних арифметических, определенных при усреднении результатов анализа нескольких АСМ-изображений макромолекул[15)].

Эксперимент проводили в тех же условиях и с тем же зондом, что и для случая анализа деформаций ВТМ. Однако в рассматриваемом случае деформация молекул ДНК уже не описывается законом «две третьих» (2.25). Вместо этого наблюдаем обычную линейную зависимость, т.е. закон Гука. Но это и естественно, поскольку теория контактных деформаций справедлива при условии *малости* деформаций объекта в сравнении с его радиусом кривизны. Последнее не выполняется для случая АСМ-исследований молекул ДНК, поскольку их относительные деформации велики в стандартных экспериментальных условиях, см. таблицу 2.2. Кроме того, вообще применимость континуальной теории и использование макроскопических параметров (типа модуля Юнга) для описания деформации *отдельной молекулы* ДНК, вызывает сомнения. Тем не менее, смысл проведенного анализа в том, что он позволил качественно объяснить, почему относительные деформации под воздействием зонда тем выше, чем меньше радиус кривизны объектов, см. таблицу 2.2.

То, что для случая молекул ДНК экспериментально измеренные относительные деформации велики даже при малых силах воздействия

[15)] для каждого значения силы анализировали 20 АСМ-изображений молекул ДНК

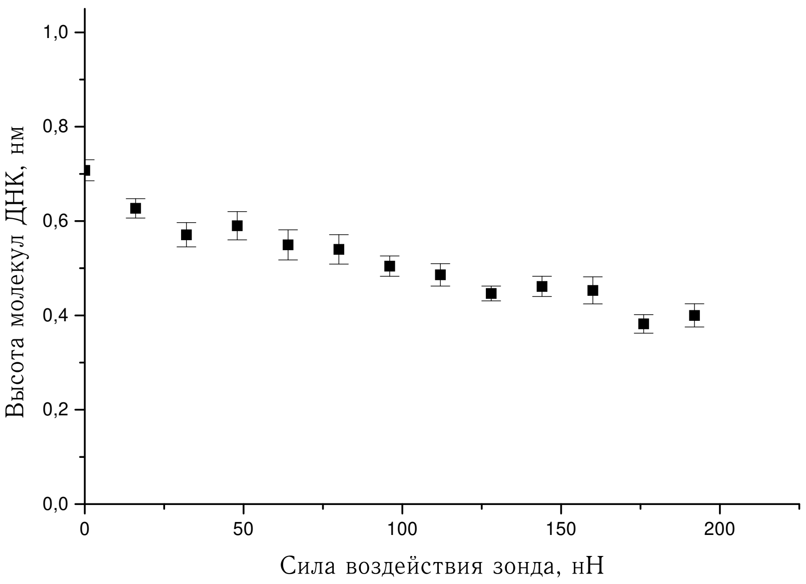


Рис. 2.3. Экспериментальная зависимость деформации молекул ДНК от величины нагружающей силы воздействия зонда при сканировании

зонда, объясняется, опять же, присутствием капиллярных сил (капиллярного мостика), не позволяющих минимизировать силу воздействия зонда на образец при сканировании на воздухе до значений меньших, чем несколько наноньютонов; из-за малости радиуса кривизны молекулы ДНК этого значения силы уже достаточно для того, чтобы значения относительной деформации были велики, см. таблицу 2.2.

Краткие выводы

Итак, мы применили теорию контактных деформаций для описания эффекта занижения высот АСМ-изображений. Получены аналитические формулы, позволяющие количественно описать данный эффект (для цилиндрического образца); разработанный подход продемонстрировал согласие с экспериментом и позволил объяснить основные экспериментально наблюдаемые закономерности. Предложена методика определения значения модуля упругости отдельного микрообъекта, адсорбированного на поверхность твердой подложки, методом АСМ.

2.1.4. Динамика переходного процесса контактных деформаций

Покажем, что характерное время установления контактных деформаций меньше типичных значений времени взаимодействия зонда и локального участка образца при сканировании. Этим обоснуем применимость *статических* формул для контактных деформаций в задачах, связанных с АСМ-исследованиями.

Рассмотрим контакт зонда и плоского образца. При приложении силы F в статическом случае их сближение за счет деформации будет определяться формулой (2.7). Однако при мгновенном приложении силы к касающимся телам это значение h будет достигнуто не сразу, а в результате переходного процесса динамического изменения h во времени. Уравнение, описывающее рассматриваемый переходный процесс для $h(t)$, может быть получено из элементарных рассмотрений баланса сил взаимодействия (прилагаемой извне F и обусловленной упругим откликом $\sqrt{R}h^{3/2}/D$, см. (2.7)):

$$
\begin{aligned}
&m\ddot{h} + \alpha\dot{h} + \frac{\sqrt{R}}{D}h^{3/2} = F \\
&h(0) = 0, \quad \dot{h}(0) = 0
\end{aligned}
\tag{2.26}
$$

где m — масса зонда (вместе с левером), α — коэффициент затухания, остальные параметры определены выше.

График численного решения уравнения (2.26) приведен на рисунке 2.4. При решении мы воспользовались значениями таблицы А.1 для оценки масс зондов и кантилеверов (было определено, что эти значения лежат в диапазоне $10^{-10} \div 10^{-11}$ кг). Для других параметров задачи мы выбрали следующие типичные значения: $F = 5\times10^{-9}$ Н, $D = 10^{-10}$ Па$^{-1}$, $R = 10\times10^{-9}$ нм (параметр затухания некритичен для проводимых оценок времен упругих деформаций и выбирался в разумных пределах[16]). Из решения следует, что характерные времена деформации имеют порядок $\tau \sim 10^{-6}$ сек (та же оценка может быть получена из соотношения $\tau \sim \sqrt{mh/F}$, которое следует из (2.26), и где h оценивается по (2.7)).

[16] действительно, величина параметра затухания определяет интенсивность переколебаний, но не влияет на оцениваемое характерное время *упругой* реакции системы на приложенное воздействие

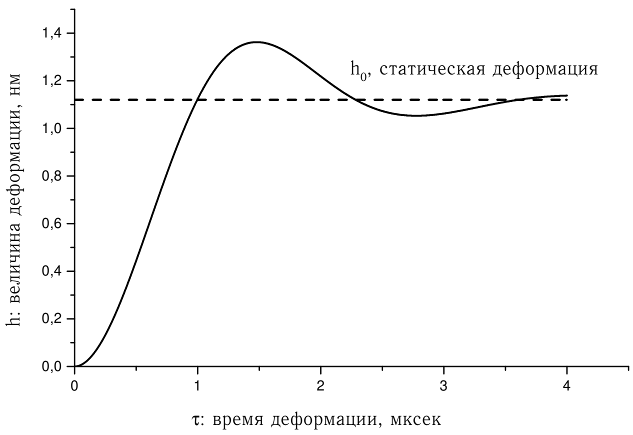


Рис. 2.4. Режим установления контактных деформаций.

Численное решение уравнения (2.26) для зависимости сближения за счет деформации h от времени при типичных параметрах АСМ-эксперимента, см. текст

Итак, мы показали, что характерные времена установления контактных деформаций (т.е. характерные времена упругого отклика системы) для случая АСМ меньше или много меньше характерных времен взаимодействия зонда и локального участка образца ($10^{-3} \div 10^{-5}$ сек, см. стр. 56). За эти времена взаимодействия переходный процесс установления контактных деформаций заведомо закончится, и поэтому использование при анализе задач АСМ формул *статической теории* контактных деформаций вполне оправдано.

2.1.5. Возможность достижения атомного (молекулярного) разрешения с помощью АСМ

Соотношение, следующее из формулы (2.6):

$$a = (FDR')^{1/3}, \tag{2.27}$$

которое определяет латеральный размер области контакта зонда и образца при сканировании плоской подложки зондом с радиусом кривизны кончика R' (при величине нагружающей силы F), должно, на первый взгляд, рассматриваться как фундаментальный предел достижимого латерального разрешения АСМ при измерении топографии поверхности.

Рассчитанная по формуле (2.27) оценка, что при типичных условиях АСМ-эксперимента $a \sim 1$ нм (см. также таблицу 2.1), означает, что площадь области контакта πa^2 имеет значение $S \sim 3$ нм^2. Если сравнить с типичной величиной площади, приходящейся на одну молекулу в плотноупакованном ЛБ слое (0,2 нм^2, см. раздел 5.3), то очевидно, что при сканировании в каждый момент времени имеет место контакт зонда не с одной, а с десятком и более молекул. Почему же, в таком случае, АСМ позволяет получать молекулярное (или атомное) разрешение при исследовании широкого спектра поверхностей кристаллических материалов и тонких пленок?

Авторы работы [65] для того, чтобы совместить результаты теории контактных деформаций (значительную величину области контакта) с возможностью наблюдения атомной и молекулярной структуры поверхности методом АСМ прибегают к предположению об игле, имеющей некоторую «особенность» ангстремных размеров. Подобное представление, что при визуализации атомной структуры с поверхностью контактирует лишь некоторая «особенность» (один крайний атом) зонда, широко распространено в силу своей наглядности (в этом случае говорят об «истинном» атомном разрешении АСМ [71]). Однако имеется также представление, что визуализация двумерной периодической структуры *возможна* и в случае, когда игла контактирует с исследуемой поверхностью несколькими атомами своего кончика [72] (в этом случае говорят о «ложном» атомном разрешении).

Анализ влияния геометрии кончика иглы (один или несколько атомов, контактирующих с поверхностью) на формирование АСМ-изображений атомной упаковки исследуемых поверхностей широко рассматривается в литературе. Например, авторы работ [73, 74] методом компьютерного моделирования исследовали ряд моделей: взаимодействие зонда с двумерной периодической структурой (атомной структурой поверхности) в случае, если зонд контактирует с поверхностью одним, тремя, четырьмя и девятью крайними атомами (при различных расстояниях между атомами). Был сделан вывод, что «истинное» атомное разрешение возможно лишь при наличии *единственного* контактирующего атома иглы. Если контактирующих атомов несколько, то было показано, что и в этом случае *возможна* визуализация двумерной периодической структуры, характеризующейся теми же параметрами элементарной ячейки, что и реальная поверхностная решетка. Однако структура самой ячейки отображается неадекватно. При определенных условиях возможна *инверсия контраста*, т.е. наблюдение минимумов АСМ-изображения *над* атомами исследуемой поверхности и максимумов между ними. Точечный дефект (пропуск одного атома решетки) также неадекватно отображается на АСМ-изображении: имеет место перераспределение его вклада по некоторой области, и, при определенных условиях, возможна визуализация «ложного» атома на месте дефекта. Т.о. речь идет о достижении «ложного» атомного разрешения.

Авторы отмечают корреляцию полученных ими результатов с экспериментальными наблюдениями, и делают вывод, что для достижения «истинного» атомного разрешения необходимо использовать иглу с единственным атомом на кончике (предлагая методику тестирования геометрии кончика иглы путем исследования точечных дефектов в атомной структуре поверхности тест-объекта).

В то же время авторы рассматриваемых работ интерпретируют этот параметр — «количество атомов на кончике иглы» — как случайный, не допускающий контролируемого изменения со стороны экспериментатора. Напротив, мы, основываясь на результатах теории контактных деформаций, предлагаем подход, связывающий наблюдаемые экспериментальные особенности АСМ-визуализации атомной (молекулярной) упаковки поверхности с контролируемыми параметрами эксперимента.

Рассмотрим, при каких условиях возможно достижение «истинного» (используя терминологию авторов [71, 72]) атомного (молекулярного) разрешения. Согласно формуле (2.27) размер контактной площадки πa^2 будет равен $0{,}2\,\text{нм}^2$ (контакт с единственным атомом при расстоянии между атомами $\sim\,0{,}5\,\text{нм}$), при радиусе кривизны зонда $10\,\text{нм}$ и достаточно жестком образце (модуль Юнга 10^{11} Па), лишь при минимизации величины силы воздействия зонда при сканировании до значения 0,1 нН, что требует специальных экспериментальных условий (исследования в жидких средах или в вакууме).

В случае проведения АСМ-исследований на воздухе минимизация силы воздействия на образец возможна, по-видимому, лишь до единиц наноньютонов. Поэтому при исследованиях на воздухе (особенно «мягких» образцов, например, тонких пленок ЛБ, см. раздел 5.3) получаемая в результате АСМ-исследования двумерная картина является «ложным» молекулярным разрешением.

Ниже покажем, что теория контактных деформаций допускает возможность достижения «ложного» атомного (молекулярного) разрешения, т.е. визуализации двумерной периодической структуры, характеризующейся теми же параметрами элементарной ячейки, что и решетка исследуемой поверхность.

В силу неоднородного распределения давления в области контакта (см. формулу (2.5)) вклад каждого атома поверхности в силовое взаимодействие зонда и образца будет определяться его положением относительно центра области контакта; количество атомов, дающих вклад во взаимодействие, определяется радиусом области контакта (2.27).

Рассмотрим следующую модель: зонд сканирует поверхность плоского образца (радиус области контакта определяется формулой (2.27)), тогда, согласно формуле (2.5), распределение давления в области контакта неоднородно, что позволяет ввести аппаратную функцию атомно-силового микроскопа[17)] вида:

$$A(x-x', y-y') \simeq$$

$$\simeq \begin{cases} \sqrt{1-\dfrac{(x-x')^2+(y-y')^2}{a^2}} & \text{если } (x-x')^2+(y-y')^2 \le a^2 \\ 0 & \text{если } (x-x')^2+(y-y')^2 > a^2, \end{cases} \tag{2.28}$$

где a — радиус области контакта (см. формулу (2.27)). Здесь мы просто воспользовались соотношением (2.5), учитывая, что, если зонд аксиально симметричен, то $a = b$, и не выписывая несущественный для проводимого ниже рассмотрения постоянный множитель. Общий вид сечения функции $A(x-x', y-y')$ при фиксированном y и $x' = 0$ приведен на рис. 2.5.

Введенная аппаратная функция позволяет связать получаемое АСМ-изображение (учитывая вклад каждого атома в суммарное силовое взаимодействия зонда и образца) $f(x, y)$ с реальной геометрией атомной

[17)] использование этой функции оправдано лишь для рассматриваемой модели плоского образца и сферического кончика зонда

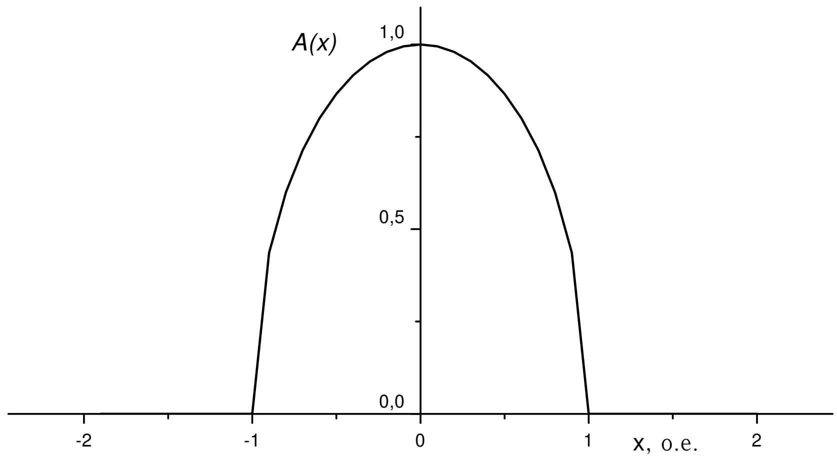


Рис. 2.5. Общий вид сечения аппаратной функции АСМ для случая плоского образца: $A(x-x', y-y')$ (при фиксированном y и $x' = 0$), см. соотношение (2.28)

структуры объекта исследования $\varphi(x, y)$:

$$f(x, y) = \iint A(x - x', y - y')\varphi(x', y')\, dx'dy' \qquad (2.29)$$

Физический смысл уравнения (2.29) таков: степень вклада каждого атома в силовое взаимодействие с иглой определяется тем, насколько он далеко находится от центра области контакта (это и описывается аппаратной функцией $A(x - x', y - y')$).

Применим разработанный подход для простейшей модели: вычисления АСМ-изображения в случае, когда атомная геометрия объекта описывается гексагональной решеткой с параметром ячейки d, а в качестве атомных функций взяты δ-функции, см. рис. 2.6.

Вычислим функцию $f(x, y)$, определяемую (2.29), для двух случаев, изображенных на рис. 2.6:

а) когда центр зонда находится над атомом, тогда

$$\varphi_1(x, y) = \sum_{m,n} \delta(x - md, y - \sqrt{3}nd) + \delta(x - \frac{d}{2} - md, y - \frac{\sqrt{3}}{2} - \sqrt{3}nd)$$

б) когда центр зонда находится между атомами, тогда

$$\varphi_2(x, y) = \sum_{m,n} \delta(x - \frac{d}{2} - md, y - \sqrt{3}nd) + \delta(x - md, y - \frac{\sqrt{3}}{2} - \sqrt{3}nd).$$

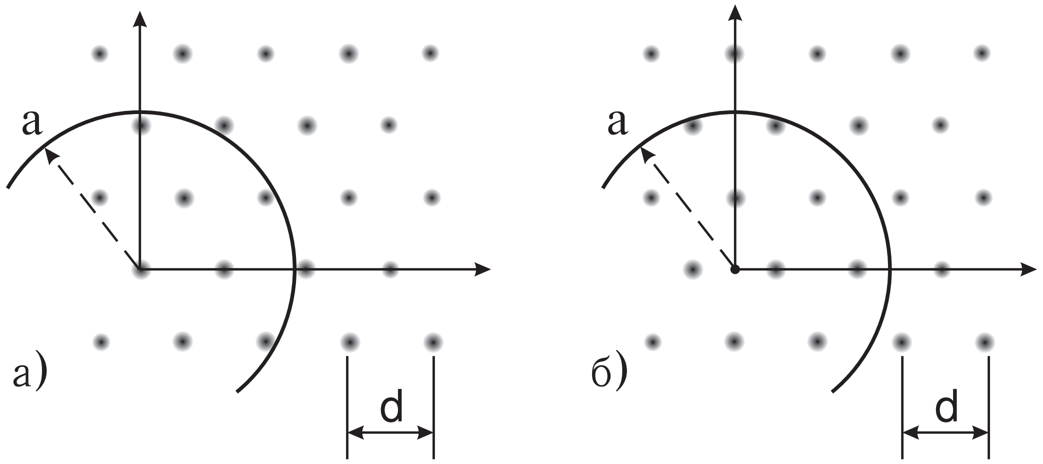


Рис. 2.6. Контакт зонда (центр в начале координат) и гексагонально упакованных атомов (описаны δ-функциями) поверхностной решетки.

К применению аппаратной функции (2.28) для вычисления *разностной* функции АСМ-изображения: а) центр зонда над одним из атомов, б) центр зонда между атомами; a — радиус области контакта (аксиально симметричный зонд), d — параметр решетки

Проводя вычисления с использованием (2.28) и (2.29), обозначая для двух случаев вычисляемые функции как f_1 и f_2, воспользовавшись свойством δ-функций, получим (пренебрегая числовыми множителями):

$$f_1 = 1 + 6\sqrt{1 - \frac{d^2}{a^2}} + 6\sqrt{1 - \frac{3d^2}{a^2}} + 6\sqrt{1 - \frac{4d^2}{a^2}} + 12\sqrt{1 - \frac{7d^2}{a^2}} + \ldots$$

$$f_2 = 2\sqrt{1 - \frac{d^2}{4a^2}} + 2\sqrt{1 - \frac{3d^2}{4a^2}} + 4\sqrt{1 - \frac{7d^2}{4a^2}} + 2\sqrt{1 - \frac{9d^2}{4a^2}} +$$

$$+4\sqrt{1 - \frac{13d^2}{4a^2}} + 4\sqrt{1 - \frac{19d^2}{4a^2}} + 4\sqrt{1 - \frac{21d^2}{4a^2}} + 2\sqrt{1 - \frac{25d^2}{4a^2}} + \ldots, \tag{2.30}$$

где d — параметр решетки, a — радиус области контакта, определяемый (2.27). При использовании выражений (2.30) суммирование следует обрывать до появления отрицательных значений в подкоренных выражениях слагаемых. Мы использовали в расчетах до 10 первых слагаемых для функции f_1 и до 20 слагаемых для функции f_2 (это соответствует контакту, максимум, с 70 атомами).

Рассмотрим функцию *видности*:

$$S = 2\frac{(f_1 - f_2)}{(f_1 + f_2)}, \tag{2.31}$$

а также *разностную* функцию АСМ-изображения[18]:

$$\Delta = (f_1 - f_2). \tag{2.32}$$

В силу изложенного в разделе 1.3.2 со стр. 27 (для разрешающей способности АСМ) отличие АСМ от оптических приборов заключается в том, что для характеристики разрешающей способности и контраста изображений следует использовать абсолютную (а не относительную) разницу между максимумами и минимумами АСМ-изображения. Поэтому далее мы будем использовать именно *разностную* функцию Δ АСМ-изображения, а не функцию видности S (которую традиционно используют для характеристики оптических приборов).

Проведем расчет разностной функции (2.32) для случая $d = 0{,}52$ нм (параметр ячейки слюды). Результаты представлены в виде графика на рис. 2.7, где приведены зависимости *разностной* функции и ее модуля от радиуса области контакта a.

Как следует из рисунка, значение *разностной* функции существенно варьирует в зависимости от параметра a, определяемого соотношением (2.27). Более того, при некоторых значениях a может изменяться знак *разностной* функции, что должно приводить к инвертированному АСМ-изображению (инверсия контраста). Но особенно следует подчеркнуть, что по мере увеличения a (и вовлечения в контакт все новых атомов) не наблюдается тенденция к снижению максимумов разностной функции, т.е. сохраняется возможность достижения «атомного» разрешения. Т.о. «ложное» атомное разрешение может быть достигнуто и при значительной величине области контакта a (т.е., например, при «тупой» игле, «мягком» образце или значительной силе воздействия зонда F).

Эти выводы, несмотря на использование упрощенной модели, качественно согласуются с наблюдаемыми нами экспериментальными закономерностями. Действительно, контраст и качество АСМ-изображений молекулярной (или атомной) упаковки исследуемой поверхности существенно зависит от величины приложенной силы воздействия зонда F, определяющей, согласно (2.27), величину области контакта a.

[18] название введено нами

Рис. 2.7. Зависимость *разностной* функции (2.32) АСМ-изображения (и ее модуля) от радиуса области контакта a.

Рассчитано для модельного случая гексагонально упакованных атомов (δ-функций, рис. 2.6), параметр решетки $d = 0{,}52$ нм

Мы проводили экспериментальные измерения спектральной плотности[19] сечения функции $F_{mp}(x, y)$ вдоль основного направления решетки АСМ-изображения поверхности слюды на пространственной частоте $k \sim 1/0{,}52\,\text{нм}^{-1}$. Измеряемая зависимость снималась при изменении величины силы воздействия зонда, которая определяет величину радиуса области контакта a по формуле (2.27) (a отложена на графике по оси абсцисс); при вычислениях мы использовали значение модуля упругости слюды $E \sim 2{,}4 \times 10^{11}$ Па, и значения радиусов кривизны используемых зондов, которые были определены с помощью тест-объектов (частиц ВТМ). Результаты измерений для трех различных зондов представлены на рис. 2.8, кривая для S_1 снята при проведении исследований на воздухе, S_2 и S_3 — при проведении исследований в водном растворе изопропанола (40–60%). Верхнее граничное значение диапазона изменения a (силы воздействия зонда) определяется предельным давлением, при превышении которого сканируемая поверхность разрушается: $P_{lim} \sim 10^{10}$ Па, что соответствует силе воздействия $F \sim 10^{-7}$ Н.

Измеряемые величины, приведенные на графиках рисунка 2.8, по своему физическому смыслу должны коррелировать с введенной выше и рассчитанной теоретически *разностной* функцией (ее модулем), см. рис. 2.7.

Однако сравнение графиков на рис. 2.8 и 2.7 не позволяет утверждать, что имеет место полная корреляция. Действительно, общей чертой сравниваемых зависимостей является лишь выраженная (квазипериодическая) зависимость анализируемых величин от значения радиуса области контакта, но максимумы сравниваемых кривых (даже экспериментальных) далеко не всегда совпадают.

Это несоответствие может объясняться достаточно упрощенными предпосылками построения модели:

- использованием в качестве атомных (молекулярных) функций δ-функций
- предположением об *аксиальной симметрии* зондирующего острия

[19] измеряли с помощью ПО «Nanoscope-IIIa» по экспериментально полученным АСМ-изображениям, записанным при различной силе воздействия зонда

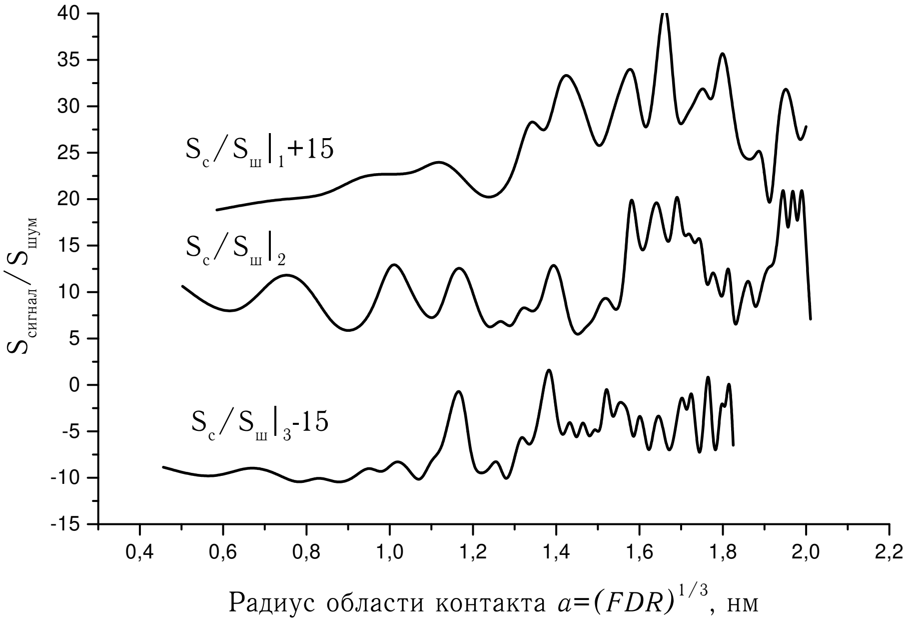


Рис. 2.8. Зависимость спектральной плотности сечения АСМ-изображения слюды от радиуса области контакта.

Анализировали сечение функции $F_{mp}(x, y)$ вдоль основного направления поверхностной решетки. Спектральную плотность измеряли на пространственной частоте $k \sim 1/0{,}52\,\text{нм}^{-1}$ для трех различных зондов при изменении силы воздействия зонда (которая определяет значение a). Кривая S_1 получена при проведении исследований на воздухе, S_2 и S_3 в водном растворе изопропанола (40 и 60%). Экспериментальные значения для каждой кривой нормированы на спектральную плотность шума (на той же частоте). Для наглядности кривые разнесены на графике на величину 15 ед.

- пренебрежением влияния среды исследования на характер силового взаимодействия зонда и образца[20)]

- кроме того, мы не принимали во внимание атомную структуру самого кончика зонда

Существенность влияния аксиальной асимметрии сканирующего зонда на измеряемые зависимости может быть подтверждена следующим экспериментальным результатом. Как и выше, мы анализировали зависимости спектральных плотностей сечений функции $F_{mp}(x,y)$ АСМ-изображений атомной упаковки поверхности (пирографита) по трем основным направлениям решетки ([01], [11] и [10]) от величины приложенной силы воздействия зонда (которая пересчитывалась в радиус области контакта); результаты приведены на рис. 2.9 (здесь спектральные плотности измеряли на пространственной частоте, соответствующей периодичности решетки графита). Для каждого значения силы воздействия зонда три анализируемые величины определяли по анализу одного АСМ-изображения. Верхний передел значения прилагаемой силы определялся динамическим диапазоном используемого левера (а не разрушением поверхности, как в случае со слюдой).

Анализ графиков рисунка показывает, что для трех основных направлений атомной упаковки пирографита измеренные функции спектральной плотности сечения АСМ-изображения зависят от радиуса области контакта *неодинаково* — отсюда, с очевидностью, следует вывод об аксиальной асимметрии сканирующего зонда. Данный эффект проявляется, в частности, в том, что на двумерной картине спектра Фурье функции АСМ-изображения относительные интенсивности шести основных рефлексов *неодинаковы* и их соотношение изменяется при вариации приложенной силы воздействия зонда. Этот эффект часто наблюдается в экспериментах (в частности, мы наблюдали его при анализе молекулярных упаковок органических пленок ЛБ, см. раздел 5.3): доминирование двух рефлексов над четырьмя другими проявляется в том, что АСМ-изображение молекулярной структуры искажается и

[20)] действительно, согласно работам Израэлашвили и Адамса [22], обнаруживших квазипериодическую и существенную зависимость силы взаимодействия двух поверхностей в жидкости от расстояния между ними, среда исследования может оказывать значительное влияние на характер силового взаимодействия зонда и образца

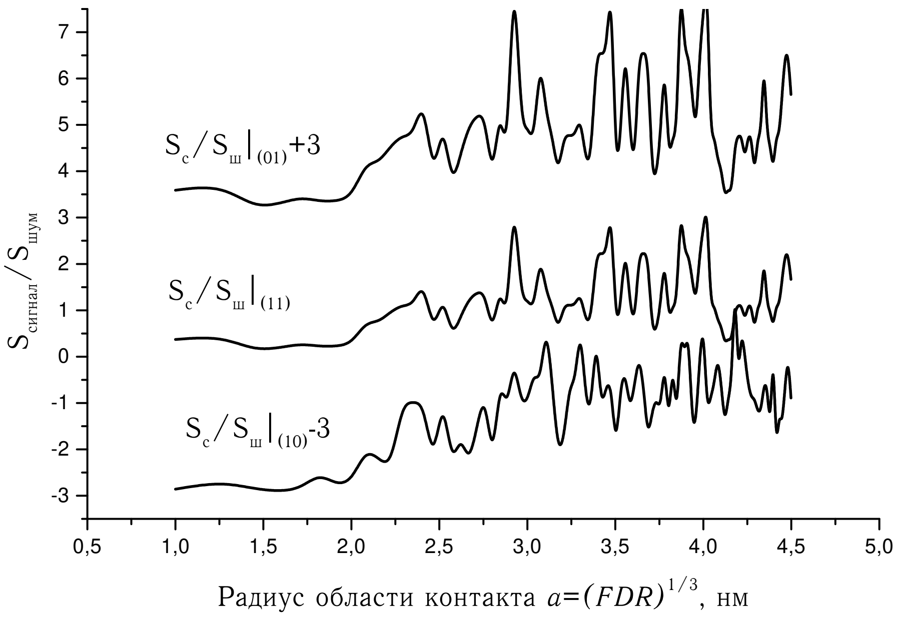


Рис. 2.9. Зависимости экспериментально измеренной спектральной плотности сечений АСМ-изображений пирографита от радиуса области контакта.

Анализировали сечения функции $F_{mp}(x, y))$ на пространственной частоте $k \sim 1/0.25\,\text{нм}^{-1}$ для трех направлений: [01], [11] и [10] атомной (гексагональной) упаковки. Экспериментальные значения для каждой кривой нормированы на величину спектральной плотности шума на той же частоте. Для наглядности кривые разнесены на графике на величину 3 ед.

имеет вид параллельных «грядок». Однако графики рис. 2.9 позволяют утверждать, что адекватным подбором величины силы воздействия зонда удается достичь одинакового значения спектральной плотности АСМ-изображения по всем трем направлениям, что мы обнаруживали экспериментально.

Количественный анализ в случае аксиально асимметричного зонда также возможен (мы его не проводили), для чего следует внести очевидные коррективы в формулы 2.30, оценив, предварительно, параметр асимметрии геометрии зонда[21)].

Стоит отметить, что, несмотря на искажения реальной картины атомной или молекулярной упаковки при АСМ-визуализации (инверсия контраста, «потеря» одного атома в базисе для случая пирографита, различная спектральная плотность сечений вдоль *эквивалентных* направлений и т.п.), метод АСМ применим для определения параметров решетки поверхности. Действительно, визуализируемая двумерная структура характеризуется теми же векторами трансляции, что и реальная исследуемая поверхность (преобразование (2.29) не может исказить значений пространственных частот двумерной периодической функции исследуемой поверхности).

Итак, рис. 2.7 позволяет утверждать, что при увеличение области контакта зонда и образца и вовлечения в контакт значительного количества атомов образца *сохраняется возможность* визуализации двумерной периодической структуры с теми же параметрами решетки, что и исследуемая поверхность («ложное» атомное разрешение). Экспериментальные графики рис. 2.8 и 2.9 подтверждают этот вывод, демонстрируя качественное совпадение с теорией.

Краткие выводы

Мы предложили механизм АСМ-визуализации атомной и молекулярной упаковки исследуемых поверхностей (основываясь на результатах теории контактных деформаций), ввели аппаратную функцию прибора для этого случая, продемонстрировали ее применение для вычисления *разностной* функции контраста АСМ-изображения в модельном случае, получили экспериментальные зависимости для спектральной плотности

[21)] путем анализа тест-объектов

АСМ-изображения вдоль основных направлений решетки образцов[22] и качественно объяснили ряд экспериментально наблюдаемых закономерностей.

Важной отличием разработанного подхода в сравнении с описанными в литературе является то, что он позволяет однозначно связать особенности (контраст, качество и пр.) получаемого АСМ-изображения атомной структуры поверхности с реальными параметрами эксперимента (силой воздействия зонда, модулями упругости зонда и образца, радиусом кривизны иглы и степенью ее асимметрии), а не с абстрактным «количеством атомов на кончике иглы».

2.2. Задача восстановления реальной геометрии объектов по АСМ-изображению (учет эффекта уширения)

Эффект уширения проявляется в том, что отдельные микрообъекты, адсорбированные на подложку и визуализированные АСМ, имеют завышенные значения ширины профиля. Этот эффект может быть полезен. Так, например, при АСМ исследованиях нуклеиновых кислот он облегчает идентификацию молекул: «уширенные» молекулы[23] легче обнаружить на кадре значительной площади, что облегчает набор статистики. В силу этого при исследовании нуклеиновых кислот эффект уширения позволяет обходится без дополнительного контрастирования макромолекул (комплексообразованием с белками и пр.).

Эффект уширения связан с тем, что зондирующее острие микроскопа имеет конечный радиус кривизны кончика. Эту аппаратную погрешность трудно преодолеть, поскольку уменьшение радиуса кривизны кончика зонда (использование более острых зондов) приводит к увеличению давления в области контакта (при том же значении величины контактных сил, см. формулу (2.8) стр. 55); значительная величина контактного давления может привести, в свою очередь, к частичному разрушению зонда при сканировании. Уменьшить контактное давление можно при наблюдении поверхности образцов в жидкостях, поскольку в этом слу-

[22] слюды и пирографита

[23] ширина профиля молекулы ДНК завышается в 5–10 раз

чае можно поддерживать контактные силы на существенно более низком уровне [50].

Эффект уширения может весьма существенно (особенно при значительном радиусе кривизны кончика зондирующего острия) искажать морфологию поверхности при ее визуализации методом АСМ. Наглядное сравнение результатов АСМ и электронной микроскопии при исследовании одних и тех же поверхностей проводят авторы работы [75]. Приведенные изображения показывают, что при исследовании поверхностей, характеризующихся сложной морфологией, искажающее влияние эффекта уширения АСМ может привести к потере информации на получаемых изображениях.

При исследованиях биологических и органических объектов часто возникает задача определения влияния эффекта уширения на АСМ-профиль объекта, адсорбированного на поверхность твердой подложки. Искажающее влияние эффекта уширения и контактных деформаций приводит к тому, что для восстановления реальной геометрической формы объекта исследования по его АСМ-изображению необходим дополнительный математический анализ с использованием определенных модельных представлений о геометрии зонда (конус со сферическим кончиком, параболоид и пр.) и априорных представлений о форме объекта исследования.

Известные методики восстановления реальной геометрии объектов исследования АСМ

В работе [76] предложена универсальная компьютерная методика деконволюции АСМ-изображений, включающая два этапа: определение геометрии используемого острия с помощью тест-объектов и свертку инвертированной геометрии острия с измеренным АСМ-профилем; эта процедура позволяет во многих случаях восстановить исходный профиль объекта с высокой точностью.

Мы проводили тестирование данной методики, решая задачу восстановления геометрии объектов, адсорбированных на поверхность плоской подложки. Анализ показал, что восстановленные по данной методике латеральные размеры объекта (ширина на полувысоте[24)]) существен-

[24)] этот параметр используется при определении объема исследуемого объекта но *завышены* при условии, что радиус кривизны объекта *меньше* радиуса кривизны кончика зонда (ошибка тем выше, чем больше разница радиусов). Это обстоятельство осложняет применимость рассматриваемой методики при исследованиях ряда биообъектов (отдельных макромолекул, их комплексов и пр.) в силу малости размеров последних в сравнении с радиусом кривизны кончика зонда АСМ. Так, при радиусе кривизны зонда 15 нм и радиусе объекта 2,5 нм (типичные значения для исследований биообъектов) погрешность (завышение) восстановленных значений ширины составляет для тестируемой методики более 50%.

В работе [77] предложена методика восстановления объема исследуемых частиц (по АСМ-профилю), не включающая стадию предварительного тестирования зонда: как геометрия зонда, так и геометрия объектов исследования, определяемые соответствующими радиусами кривизны, может быть восстановлена путем анализа одного и того же АСМ-изображения. Однако данная методика, включающая использование для описания геометрии поверхностных структур значение *радиуса кривизны*, сводит задачу к рассмотрению геометрии контакта сферического зонда и *сферического* образца.

Возможность получения в этом случае дополнительной информации (т.е. не только параметров объекта, но и зонда из одного АСМ-изображения) может быть проиллюстрирована следующим. Мы ниже приводим решение задачи определения истинной ширины ($2a$) эллипсоидального в сечении объекта по известным параметрам: высоте ($2b$), ширине АСМ-профиля на полувысоте ($2d$) и радиусу зонда R. При этом возможным оказывается указать дополнительные соотношения (2.38, 2.39), связывающие указанные параметры. Модель сферического образца позволяет описать его геометрию одним параметром — радиусом кривизны (без использования предположения о связи этого параметра с высотой объекта над поверхностью подложки). Подобное уменьшение числа параметров задачи позволяет извлечь, путем анализа геометрии контакта, дополнительную информацию.

Авторы работы [78], отмечая, что при достаточно «остром» профиле исследуемых поверхностных структур на АСМ-изображении будет отображаться лишь профиль более «тупой» иглы, при сравнительном анализе также оперируют параметрами соответствующих радиусов кривизны (зонда и исследуемых поверхностных структур).

Но в силу имеющихся представлений о существенной роли *контактных деформаций* (раздел 2.1) в исследованиях АСМ можно предположить, что модель *сферической* геометрии образца и использование для ее описания соответствующего *радиуса кривизны* вряд ли адекватна при решении задачи восстановления геометрии адсорбированных *биообъектов*, характеризующихся, как известно, невысокими значениями модуля упругости. Более общей является модель, позволяющая учесть эффект уширения при контакте иглы с *деформированной* частицей, имеющей *эллипсоидальное* сечение. Решение данной задачи позволяет определить объем частицы, выразив его через параметры эллиптического сечения: найденного значения a и связанного с высотой частицы значения $b = h/2$. Но, насколько нам известно, в литературе отсутствуют работы, посвященные применению модели *эллипсоидального объекта* для анализа экспериментальных АСМ-изображений; ниже мы излагаем разработанную методику решения данной задачи.

2.2.1. Постановка и решение задачи об определении ширины объектов по измеренным параметрам АСМ-профиля

Мы применили для учета эффекта уширения геометрическую модель (рис. 2.10), учитывающую взаимодействие объекта только с кончиком зонда (предполагается, что нет контакта со стенками пирамиды). Это оправдано в том случае, когда высота исследуемых структур над подложкой не превышает радиуса кривизны кончика иглы.

Кончик зонда аппроксимировали либо полусферой радиуса R, либо параболоидом вращения ($z = k\rho^2$, где k — коэффициент параболы). При этом было показано, что результаты применения двух методик фактически тождественны: количественное расхождение в ответах составляет менее 10%. Стоит отметить, что аппроксимация иглы с помощью полусферы более наглядна и более широко используется в литературе. Мы ниже приводим алгоритмы использования обоих подходов.

Исследуемую частицу описывали моделью эллипсоида. Т.е. мы исходим из априорных представлений о контактной деформации образца под действием зонда, см. раздел 2.1. В сечении объекта исследования — эллипс с полуосями a и b. Ставили задачу по заданным значениям высоты объекта ($h = 2b$), параметра геометрии зонда R (или k для параболичес-

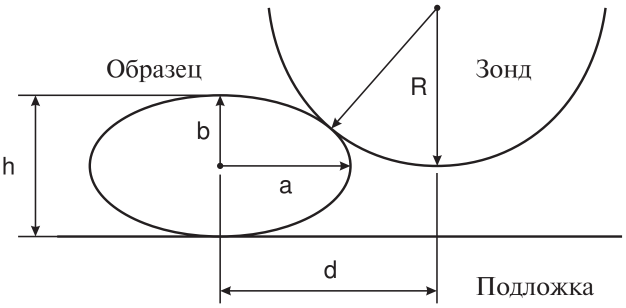


Рис. 2.10. Геометрия контакта зонда и образца (к объяснению эффекта уширения)

$2d$ — измеренная ширина профиля АСМ-изображения объекта на полувысоте, $2a$ — истинная ширина объекта, R — радиус кончика зонда, $h = 2b$ — высота профиля объекта над подложкой

кой аппроксимации) и ширины профиля АСМ-изображения частицы на ее полувысоте ($2d$) найти значение истинной ширины объекта $2a$.

Запишем систему уравнений для эллипса (сечение профиля исследуемой частицы) и окружности (сечение профиля иглы):

$$\begin{cases} y_{ell} = b\sqrt{1 - x^2/a^2} \\ y_{cir} = R - \sqrt{R^2 - (x - d/2)^2} \end{cases}$$

В модели параболической иглы второе уравнение системы примет вид: $y_{par} = k(x - d/2)^2$.

Для решения задачи ставили условия для точки контакта с координатами (x_0, y_0): равенство касательных к эллипсу и к окружности (параболы) и удовлетворение координат точки контакта уравнениям эллипса и окружности (параболы):

$$\begin{cases} b\sqrt{1 - x_0^2/a^2} = R - \sqrt{R^2 - (x_0 - d/2)^2} \\ d\, y_{ell}/d\, x|_{x_0, y_0} = d\, y_{cir}/d\, x|_{x_0, y_0} \end{cases} \tag{2.33}$$

Для модели параболической иглы в системе (2.33) вместо уравнения окружности использовали уравнение параболы.

Данную систему аналитически сводили к одному уравнению с одним неизвестным (x_0)[25], для которого был создан алгоритм численного решения[26]. Ниже мы приводим эти уравнения для случая сферической

[25] для x_0 уравнение проще

[26] далее, по найденному x_0 определяли a

иглы:

$$\left[b^2 - \left(R - \sqrt{R^2 - (x_0 - d)^2}\right)^2\right] \sqrt{R^2 - (x_0 - d)^2} + \\ + x_0(x_0 - d)\left(R - \sqrt{R^2 - (x_0 - d)^2}\right) = 0 \qquad (2.34)$$

и для нахождения a по численно определенному x_0:

$$a = \frac{x_0}{\sqrt{1 - \left(R - \sqrt{R^2 - (x_0 - d)^2}\right)^2 / b^2}} \qquad (2.35)$$

Аналогично, для случая параболической иглы имеем уравнение относительно x_0 для построения численного решения:

$$k^2(x_0 - d)^3(x_0 + d) + b^2 = 0 \qquad (2.36)$$

и уравнение для определения a:

$$a = \sqrt{\frac{x_0(x_0 + d)}{2}} \qquad (2.37)$$

Аналитически было показано, что полученное уравнение (2.34) для сферической иглы не имеет решения (на интересующем нас интервале) только в том случае, когда выполняется система неравенств:

$$\begin{cases} R > d/2 \\ b > R - \sqrt{R^2 - d^2/4} \end{cases} \qquad (2.38)$$

Аналогично, уравнение для параболической иглы (2.36) не имеет решения на интересующем нас интервале в случае, когда выполняется условие:

$$b > kd^2 \qquad (2.39)$$

Смысл данных ограничений очевиден: если измеренный АСМ-профиль объекта достаточно «острый», то игла, которой он был получен, не могла быть «тупой». Полученные соотношения (2.38, 2.39) являются, по-видимому, частным случаем более общего подхода к оценке геометрии иглы, изложенного в работе [79]. Автор данной работы теоретически обосновывает возможность оценки «остроты» иглы (определение верхнего предела) путем анализа морфологии особенностей получаемого АСМ-изображения при произвольной, но достаточно неоднородной структуре исследуемой поверхности. Однако соотношения (2.38, 2.39), полученные нами, более просты и наглядны, чем общий подход, изложенный в работе [79], и могут быть весьма полезны при интерпретации экспериментальных результатов.

Уравнения (2.34–2.37) использовали для построения численного решения (см. текст программы на стр. 223): уравнения (2.34) и (2.36) решали методом *вилки* [70] относительно x_0, далее по уравнениям (2.35) и (2.37) определяли искомое значение a.

Возникает вопрос, если все равно задача решалась численно, то почему нельзя было исходить непосредственно из системы (2.33), сведя ее, например, к системе нелинейных уравнений и находя их численное решение. Однако оказывается, что специфика системы не позволяет в этом случае построить достаточно простого численного решения, поскольку сколь угодно малые отклонения от точного решения приводят к отрицательным значениям в подкоренных выражениях, входящих в решаемую систему. В силу этого предложенный метод является, несмотря на необходимость предварительных аналитических выкладок, достаточно простым, кроме того, он имеет важную особенность: проверка выполнения условий (2.38) и (2.39) позволяет заранее определить случаи отсутствия решений и получить информацию о допустимом значении параметров геометрии зонда R или k.

Определение точного значения радиуса R (или k) для конкретного зонда требует его тестирования непосредственно перед использованием (по результатам исследования тест-объектов, например, вируса табачной мозаики — удобного природного «наноразмерного» объекта с фиксированными геометрическими параметрами, см. раздел 3.1). Однако и в этом случае существует вероятность того, что в процессе сканирования форма иглы претерпит изменения в результате взаимодействия с объектом. В этой связи чрезвычайно полезным является получение информации о форме зонда непосредственно из АСМ-изображений объекта исследования.

При анализе АСМ-изображений объектов, для которых необходимо восстановить истинную ширину, измеряется пара значений: высота и ширина на полувысоте; результатом анализа является набранная статистика пар этих значений. Анализируя выполнимость соотношений (2.38, 2.39) при различных параметрах геометрии зонда, можно определить предельное значение R (или k) выше (для k — ниже) которого наблюдается рост числа случаев отсутствия решения (для набранной статистики пар значений параметров объекта b и d). Это и будет верхнее граничное значение для оцениваемого радиуса кривизны иглы. Типичный пример зависимости числа случаев отсутствия решения для набранной статистики пар b и h от радиуса кривизны иглы представлен на рис. 4.5, стр. 135.

К вопросу о применимости разработанной методики

Следует подчеркнуть, что разработанная методика не учитывает возможного дополнительного вклада в уширение, связанного с частичным увлечением образца зондом при сканировании. Эффект увлечения обусловлен латеральными силами взаимодействия зонда и образца, которые характеризуются достаточно большой интенсивностью при проведении исследований в контактном режиме на воздухе. По нашим оценкам данный эффект, в основном, может проявляться при исследовании объектов, имеющих небольшую величину площади сечения (например, одиночных молекул ДНК), и приводить к 1,5–2,5-кратному завышению значения ширины объекта $2d$ и, как следствие, восстанавливаемого значения a.

Ослабить влияние эффекта увлечения образца зондом можно путем уменьшения интенсивности силового латерального взаимодействия зонда и образца. Это достигается при применении режима прерывистого контакта, особенно в случае проведения исследований в жидких средах.

Погрешность восстановленных значений

Основная погрешность восстановленных значений a вносится погрешностью измерения полуширины АСМ-профиля объекта d. Мы тестировали разработанную методику, восстанавливая ширину тест-объектов — частиц ВТМ — по измеренным параметрам их АСМ-изображений (высота $2b$ и ширина профиля $2d$). При этом анализировали зависимость погрешности решения (истинной ширины объекта $2a$) от погрешностей входных параметров.

Было обнаружено, что в меньшей степени погрешность решения (Δa) зависит от погрешностей параметра геометрии зонда (ΔR или Δk) и погрешности измеренной высоты объекта (Δb). Относительная величина стандартного отклонения для восстановленных значений ширины этих объектов в два–три раза меньше, чем относительная величина стандартного отклонения входных параметров высот[27], и в полтора–два раза меньше, чем та же величина для параметра геометрии зонда[28].

В наибольшей степени погрешность решения определяется погрешностью параметра ширины профиля АСМ-изображений $2d$. Относительная величина стандартного отклонения для восстановленных значений истинной ширины объекта в два раза *превышает* относительную величину стандартного отклонения входных значений ширины профиля его АСМ-изображения. Т.о. именно вклад погрешности параметра d в погрешность решения является определяющим.

Погрешность измерения d может быть обусловлена описанным выше эффектом частичного увлечения объектов зондом при сканировании. Значительная асимметрия иглы также увеличивает эту погрешность, поскольку значения ширины в этом случае зависят от ориентации объектов. В силу этого стандартное отклонение восстановленных значений истинной ширины объектов исследования по результатам анализа их АСМ-изображений может превышать 20%. Увеличить точность результата исследования можно путем уменьшения эффекта увлечения (исследования в режиме прерывистого контакта в жидкости), а также (потенциально) путем определения и учета степени асимметрии иглы. Кроме того, величина ошибки может быть уменьшена при наборе достаточно *большой статистики* анализируемых параметров АСМ-изображений объектов.

Краткие выводы

Разработана методика восстановления реальной ширины объектов, адсорбированных на поверхность подложки, по двум измеренным параметрам АСМ-изображения (высота и ширина на полувысоте АСМ-профиля) и измеренному параметру геометрии зонда (радиус кривизны R или коэффициент параболы k).

Особенностями разработанного алгоритма являются:

- наличие «внутреннего репера»: соотношения (2.38, 2.39) позволяют получить информацию о геометрии зонда из анализа набран-

[27] при условии, что погрешности двух других параметров нулевые

[28] при том же условии, что и выше

ной статистики параметров АСМ-изображений объектов исследования;

- общность подхода: он позволяет анализировать случай не только сферического, но и эллипсоидального в сечении объекта;
- простота в реализации: компьютерный анализ сводится к нахождению корней одного уравнения с одним неизвестным (формула (2.34) или (2.37));
- алгоритм разработан как для модели сферической, так и параболической иглы, при этом результаты применения этих моделей фактически идентичны.

Разработанный здесь алгоритм может служить прототипом для общего подхода восстановления геометрии объектов с учетом *трехмерной геометрии* иглы. Действительно, мы рассматривали случай аксиально симметричной иглы, что позволяло свести задачу о контакте к двумерному случаю (через рассмотрение сечения области контакта). Но возможно обобщение задачи на трехмерный случай, что позволит использовать модель асимметричной иглы. Общая схема программы должна остаться той же: в процессе тестирующей фазы АСМ-изображения тест-объекта используются для восстановления формы иглы, далее, трехмерные аналоги соотношений (2.34–2.37) позволяют построить решение для восстановления формы объектов. При этом в качестве входных данных используется непосредственно АСМ-изображение «уширенных» объектов исследования, а результатом работы программы будет служить изображение объектов с восстановленной (реальной) геометрией.

Глава 3

АСМ-исследования взаимодействия вирусной РНК с белками

[1] Вирусные частицы являются простейшими природными объектами, способными к репликации. Они состоят из носителя генетической информации (молекулы нуклеиновой кислоты) и оболочки, образованной белковыми молекулами. Репликация вирусных частиц осуществляется только внутри клеток живых организмов, при этом ее процесс регулируется спецификой взаимодействия молекулы нуклеиновой кислоты с белками.

3.1. Исследование процессов разрушения белковой оболочки частиц вируса табачной мозаики и высвобождения вирусной РНК

Вирус табачной мозаики представляет собой полый цилиндр, имеющий длину около 300 нм, внутренний диаметр 4 нм и внешний диаметр 18 нм (согласно данным электронной микроскопии [29]). Каждая вирусная частица состоит из 2200 белковых субъединиц, организованных в право-

[1] Результаты, изложенные в данной главе, получены в ходе совместной работы с лабораторией нуклеиново-белковых взаимодействий отдела химии и биохимии нуклеопротеидов НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, заведующий лабораторией — д. х. н. Ю. Ф. Дрыгин

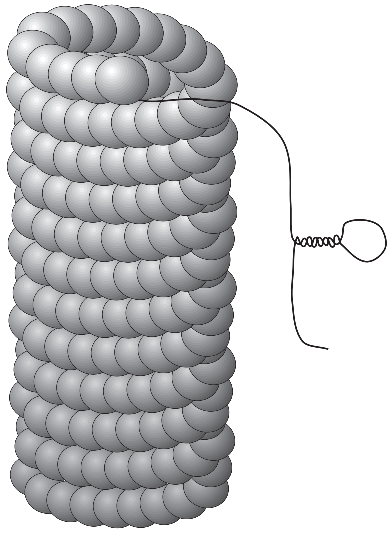


Рис. 3.1. Структура вируса табачной мозаики;

вирусная частица изображена частично «разрушенной» с частично высвобожденной макромолекулой РНК, сохраняющей элементы вторичной структуры

винтовую спираль с шагом $16\frac{1}{3}$ субъединиц на виток. Вирусная РНК, состоящая из $6400 \div 6600$ нуклеотидов, также образует спираль, каждый виток которой располагается между двумя витками спирали белковых субъединиц, см. рис. 3.1.

Вирус табачной мозаики является удобной модельной системой для апробирования методик приготовления образцов, позволяющих проводить АСМ-исследования взаимодействия *однонитевой* вирусной РНК с белками.

В настоящее время разработаны различные методы фиксации макромолекул линейной ДНК, кольцевой плазмидной ДНК и двунитевой РНК на поверхностях различных подложек для исследований СЗМ, (см. раздел 1.5.1 со стр. 39). Однако в литературе практически отсутствовали работы (до нашей публикации [80]), посвященные СЗМ-исследованию высокомолекулярной *однонитевой* РНК. Это объясняется спецификой молекулы однонитевой РНК — отсутствием регулярной двойной спирали, и, как следствие, меньшей «жесткостью», что затрудняет фиксацию этой макромолекулы на подложке в расправленном состоянии.

Авторы работы [81] использовали традиционную методику (см. раздел 1.5.1) иммобилизации нуклеиновых кислот на поверхности слюды катионами Mg^{2+}, добавляемыми в рабочий раствор. В качестве объектов исследования они выбирали, в частности, короткие (25 и 50 оснований) молекулы однонитевой ДНК, а также РНК-гомополимера поли-А[2)]. Авторы обнаружили, что по используемой методике препарирования образцов только молекулы поли-А возможно иммобилизовать на подложке в расправленном состоянии — в отличие от адсорбированных молекул однонитевой ДНК, которые характеризовались компактной глобулярной структурой. Это наблюдение показывает, что основным препятствием при расправлении на подложке однонитевых молекул нуклеиновых кислот является образование внутримолекулярных пар оснований (по механизму Уотсона-Крика [27]). Действительно, молекулы ДНК, используемые авторами работы [81], могли формировать подобные внутримолекулярные пары (судя по приводимой авторами последовательности нуклеотидов этих молекул), в отличие от молекул поли-А, являющегося гомополимером, образованным лишь одним типом нуклеотидов.

Традиционная методика приготовления РНК в расправленном состоянии для электронной микроскопии включает образование комплекса РНК с монослойной пленкой белков (цитохром С или диизопропилфосфаттрипсин) на поверхности раздела фаз воздух/вода и последующий перенос пленки с молекулами РНК на поверхность пленки-подложки [32]. Данная методика позволяет получать ЭМ-изображения молекул РНК, находящихся в двумерном расправленном состоянии [82], однако в этом случае тот факт, что РНК находится в комплексе с белками (в белковой «шубе»), может ограничить решение задач, связанных с тонкой структурой РНК и с исследованиями РНК-белкового взаимодействия.

Наблюдение свободной РНК позволяет проводить как физическое картирование элементов вторичной структуры РНК, так и исследовать специфическое взаимодействие с ней белков, узнающих определенные (например, регуляторные) последовательности нуклеотидов. В свою очередь, исследование взаимодействия вирусной РНК и белков может дать вклад в понимание механизмов процесса сборки и размножения вирусов, структурной организации и функционирования рибонуклеопротеидов.

Поэтому в работе мы уделили внимание разработке методик приготовления вирусной РНК и рибонуклеопротеидов для исследований СЗМ.

[2)] А — аденин

Экспериментальная часть

[3] Для приготовления всех растворов использовали деионизованную бидистиллированную воду. Препарат вируса (ВТМ, штамм U1), полученный методом дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности раствора сахарозы, был любезно предоставлен Е. Н. Добровым (НИИ ФХБ МГУ).

В экспериментах по депротеинизации использовали суспензию ВТМ в воде при концентрации 2,6 мг/мл. Депротеинизацию вирусных частиц производили:

- 72% раствором диметилсульфоксида (ДМСО) [83], экспозиция 30 мин при комнатной температуре, для остановки реакции к смеси добавляли равный объем воды (до 36% концентрации ДМСО — при этих условиях процессы самосборки и разрушения вирсуных частиц находятся в динамическом равновесии);

- 4 М раствором мочевины [84], экспозиция 2,5 часа при 0°C, для остановки реакции к смеси добавляли полуторный объем воды (до 1,6 М концентрации мочевины — при этих условиях процессы самосборки и разрушения вирсуных частиц также находятся в динамическом равновесии);

- 0,1 М раствором глицина со значением pH 10,4 [85], экспозиция 3 часа при 0°C, для остановки реакции добавляли ацетат калия (концентрация 0,5 М при pH 5,0) в количестве одной трети от объема реагирующей смеси.

Для разделения отдельных молекул белковой оболочки ВТМ, свободной РНК и частично разрушенных вирусных частиц использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с гелем ToyoPearl HW-55. В трех используемых методиках колонки (150 мкл) предварительно уравновешивали водными растворами 36% ДМСО, 1,6 М мочевины или глицина (концентрация 0,1 М при pH 10,3), соответственно.

В качестве подложек использовали как чистые (свежий скол), так и модифицированные поверхности высокоориентированного пироліти-

[3] Образцы для исследований были приготовлены д. х. н. Ю. Ф. Дрыгиным (НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ)

ческого графита (пирографита) и слюды. Поверхность подложки модифицировали или катионным ПАВ — бензилдиметилалкиламмоний хлоридом (BAC) (1% раствор в формамиде, экспозиция 45 мин) [86] или 100 мМ $MgCl_2$ (см. раздел 1.5.1), экспозиция 75 мин. Процесс модификации завершали промывкой водой (в 0,2 мл четыре раза по 1–2 мин), излишек воды удаляли фильтровальной бумагой и подложки высушивали в струе фильтрованного сжатого воздуха.

Молекулы РНК, высвобожденные из белковой оболочки ВТМ, или частично разрушенные вирусные частицы посредством обработки мочевиной или диметилсульфоксидом наносили на подложку из 1,6 М раствора мочевины или 36% диметилсульфоксида соответственно, разделив предварительно эти структуры на фракции по размерам методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, см. выше.

Схема эксперимента без использования хроматографии включала следующие этапы. Вирусные частицы ВТМ (0,138 мг/мл) в 2 мМ $MgCl_2$, 200 мМ KCl экспонировали 50% ДМСО и 3,7% формальдегидом в течении 5 мин при 45°С для денатурации РНК. Затем к смеси добавили 1% BAC и адсорбировали каплю препарата на поверхность слюды.

Молекулы РНК вируса энцефаломиокардита мышей, выделенные из вирусных частиц, иммобилизовали на подложке по следующей схеме. Макромолекулы (концентрация 60 мкг/мл) в 0,01 М HEPES буфере (pH 7,4) и 7,5% формальдегиде экспонировали в течении 15 мин при 55°С для денатурации. Затем или к препарату добавляли равный объем 0,1% раствора BAC в формамиде (до конечной концентрации BAC 0,05%) или к 3 частям препарата добавляли 27 частей того же раствора BAC (до конечной концентрации BAC 0,01%).

Адсорбцию исследуемых структур осуществляли (во всех случаях) из капли препарата (3–15 мкл), которую наносили на поверхность подложки и экспонировали во влажной среде под колпаком. Длительность процесса экспозиции варьировали от нескольких секунд до часа и более. После завершения экспозиции поверхность подложки также промывали водой и высушивали в струе фильтрованного сжатого воздуха.

АСМ-исследования проводили на воздухе в режимах постоянного или прерывистого контактов на приборе «Nanoscope-IIIa» («Digital Instruments», США). При проведении исследований в контактном режиме использовали кантилеверы жесткостью 0,06 Н/м из нитрида кремния.

Для исследований в режиме прерывистого контакта применяли кремниевые кантилеверы с резонансной частотой в диапазоне 350–380 кГц, (параметры кантилеверов см. в таблице А.1, стр. 227).

3.1.1. Результаты и их обсуждение

Атомно-силовая микроскопия частиц ВТМ

Частицы вируса табачной мозаики были исследованы в режимах постоянного и прерывистого контактов на поверхностях пирографита и слюды. Было обнаружено, что скорость сорбирования вирусных частиц на свежий скол поверхности существенно *выше* при использовании пирографитовой подложки, чем при использовании подложки из слюды. В первом случае при равных условиях сорбирования (температура, объемная концентрация вирусов в препарате, время промывки и пр.) поверхностная плотность вирусных частиц существенно выше. В то же время на пирографитовой подложке при сканировании в режиме постоянного контакта вирусные частицы нестабильны и увлекаются иглой даже при минимизации воздействующей силы до величины менее 1 нН. Стабильные АСМ-изображения вирусных частиц на пирографите удается получить только в режиме прерывистого контакта. В случае же использования слюдяной подложки сила адгезии вирусных частиц достаточна для проведения исследований и в режиме постоянного контакта с величиной воздействующей силы в десятки нН.

Большая скорость сорбции вирусных частиц на поверхность пирографита в сравнении со слюдой может объясняться влиянием *гидрофобного эффекта*, см. раздел 1.3.1 (стр. 21). В пользу данного утверждения говорит тот факт, что в случае *гидрофобизации* поверхности слюды посредством обработки ВАС скорость сорбции вирусных частиц *увеличивается*.

Нестабильность адсорбированных на пирографит вирусных частиц в процессе сканирования в режиме постоянного контакта объясняется слабой адгезией частицы, обусловленной инертностью подложки (гидрофобный эффект не дает вклад в силу адгезии после высушивания образцов, поскольку проявляется только в водной среде).

АСМ-изображения частиц вируса табачной мозаики приведены на рис. 3.2. Согласно анализу полученных данных, для вирусных частиц среднее значение длины составляет 310 нм, при этом среднеквадратичное отклонение от среднего составляет 30% (число проанализированных АСМ-изображений вирусов N=120). Столь широкое распределение объясняется, во-первых, частичным разрушением вирусных структур при приготовлении препарата и, во-вторых, агрегацией вирусных частиц торец в торец (это, в частности, проявляется в наличии пиков на удвоенной, утроенной и т.д. длине вирусной частицы [4)]). С началом процесса обработки вирусных структур с целью высвобождения вирусной РНК максимум распределения вирусных частиц по длинам смещается в более короткую область. Так, для вирусных частиц, обработанных 50% формамидом в течение 2 мин, максимум составляет 260 нм (N=500), а для вирусных частиц, обработанных 40% ДМСО при 37° в течение 30 мин, значение максимума — 180 нм (N=270).

Анализ высот АСМ-изображений вирусных частиц над поверхностью подложки дает значение 18 ± 2 нм (независимо от режима исследования), что согласуется с результатами электронной микроскопии [29]. Как показали дополнительные исследования, высота АСМ-профиля вирусной частицы над поверхностью подложки уменьшается при увеличении силы воздействия зонда, что связано с *контактными деформациями*, см. раздел 2.1; результаты экспериментального исследования эффекта уменьшения высоты АСМ-изображений частиц ВТМ при увеличении силы воздействия изображены на рис. 2.2 стр. 68.

Частицы ВТМ, являясь природными «наноразмерными» объектами с фиксированными геометрическими параметрами, могут служить удобным тест-объектом для анализа качества зондирующего острия (определения параметров его геометрии). При минимизации силы воздействия зонда величина деформации вирусных частиц незначительна (см. экспериментальную зависимость рис. 2.2 или рассчитанные значения деформации для модельных случаев, приведенные в таблице 2.2 стр. 65). В силу этого можно считать, что частица вируса имеет в своем сечении окружность. Оценить эффект уширения (рассмотрению которого посвящен раздел 2.2) для частицы, имеющей в сечении окружность, существенно проще, чем для частицы, имеющей эллипсоидальную форму (этот случай подробно рассматривается в разделе 2.2). Согласно элемен-

[4)] частицы, являющиеся результатом агрегации, в дальнейшем из статистики исключались

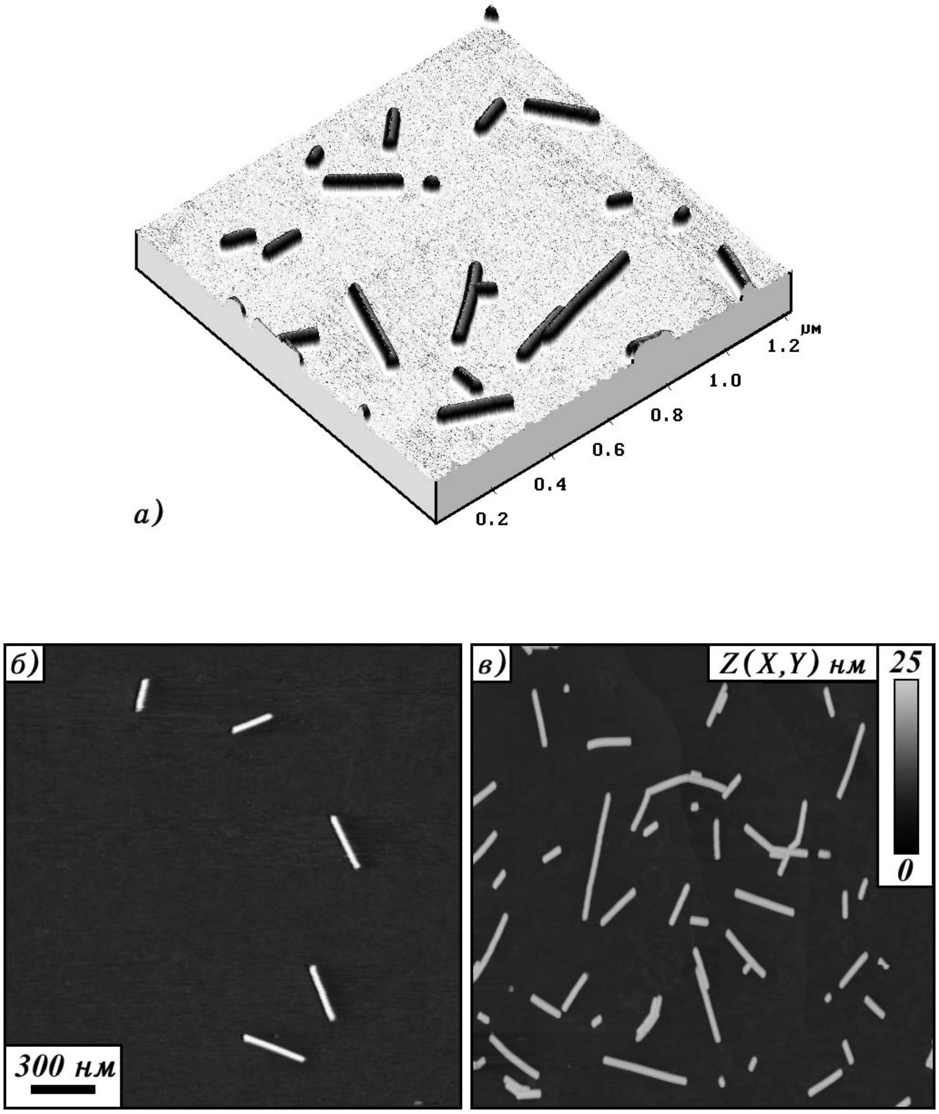


Рис. 3.2. Частицы вируса табачной мозаики.

Частицы адсорбированы в течении 7 мин на слюду (б) и 2 мин на пирографит (а, в), концентрация препарата вируса составляла 0,27 мг/мл; АСМ-исследование в режимах контакта (б) и прерывистого контакта (а,в) тарным геометрическим построениям для острия с радиусом кривизны кончика R значение реально измеряемой ширины на полувысоте АСМ-изображений вирусных частиц радиуса r должно составлять величину:

$$2d_{eff} = 2\left(2Rr + r^2\right)^{1/2} \tag{3.1}$$

Экспериментально определенные значения ширины АСМ-изображений вирусных частиц для режимов прерывистого и постоянного контактов составляют величины 30 ± 5 нм (N=270) и 32 ± 6 нм (N=400) соответственно. Воспользовавшись формулой (3.1), можно оценить радиус кривизны для кончиков зондов используемых типов кантилеверов: $R \sim 5 \div 15$ нм.

Атомно-силовая микроскопия депротеинизованных вирусных структур ВТМ с частично высвобожденными макромолекулами РНК

В мягких условиях депротеинизации наблюдали рибонуклеопротеиды (РНП) с выходящими из них (с одного конца или с обоих) нитями РНК, см. рис. 3.3 и 3.4. Мы протестировали три известные методики частичной депротеинизации ВТМ и высвобождения РНК, описанные в литературе [83, 84, 85]. Сравнительный анализ показал, что наиболее перспективным является метод с применением ДМСО (рис. 3.4). Метод депротеинизации в растворах со щелочным значением pH характеризуется большим фоном получаемых АСМ-изображений. Кроме того, молекулы РНК в этом случае склонны к агрегации и в значительной степени сохраняют элементы вторичной структуры. Метод с использованием мочевины позволяет получать АСМ-изображения с незначительным фоном, но при этом наблюдается агрегация вирусных РНП (рис. 3.3).

АСМ-изображения рисунков 3.3 и 3.4 получены в топографическом режиме $Z(X,Y)$ и в режиме измерения сил трения $F_{mp}(X,Y)$, (см. раздел 1.3); последние изображения, в силу значительной разности высот частиц ВТМ и молекул РНК, характеризуются лучшим контрастом в сравнении с топографическими, позволяя различать на АСМ-изображении оба типа структур.

Белковые остовы могут рассматриваться как маркеры молекул РНК, позволяя уверенно отождествлять наблюдаемые протяженные нити, выходящие из разрушенных вирусных структур, именно с молекулами вирусной РНК. Поэтому при исследовании полностью разрушенных вирусных частиц (обработкой ДМСО), используя идентичную методику

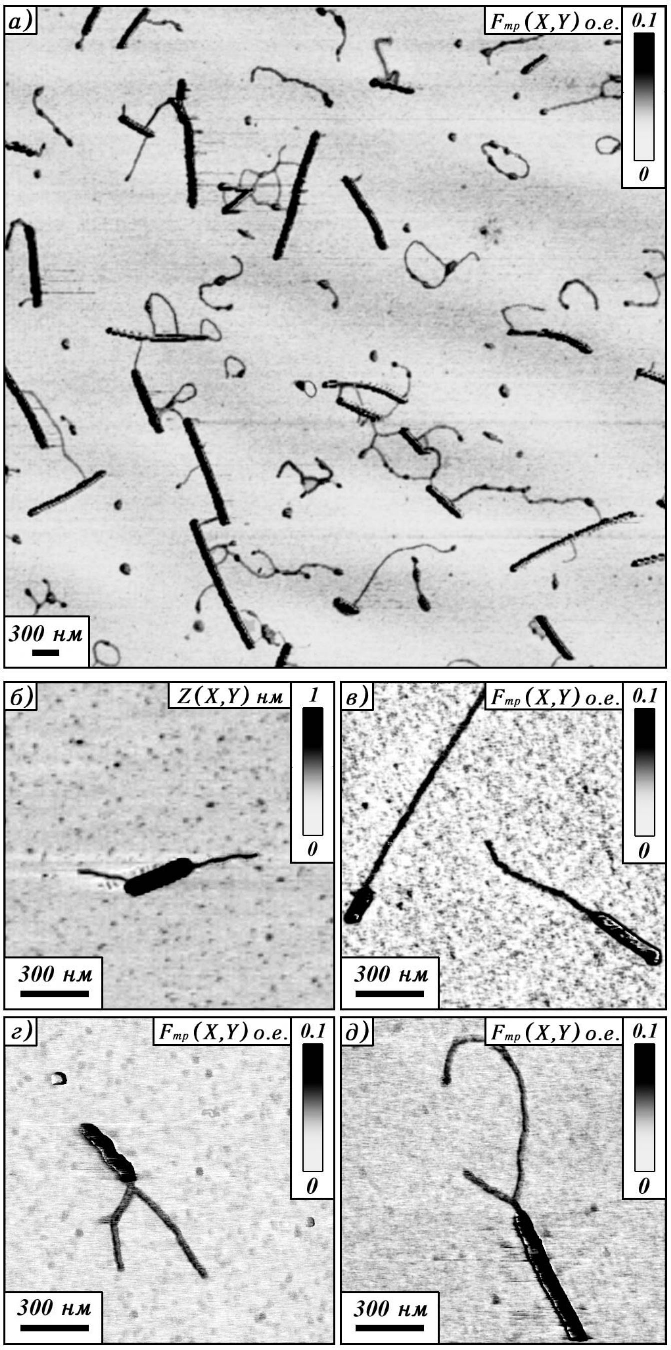


Рис. 3.3. Частицы вируса табачной мозаики, частично депротеинизованные обработкой 4 М мочевиной.

Наблюдаются белковые остовы с выходящими из них нитями РНК. Частицы адсорбированы на свежий скол слюды из 1,6 М раствора мочевины; приведены АСМ-изображения, полученные в топографическом режиме $Z(X,Y)$ и в режиме измерения сил трения $F_{mp}(X,Y)$

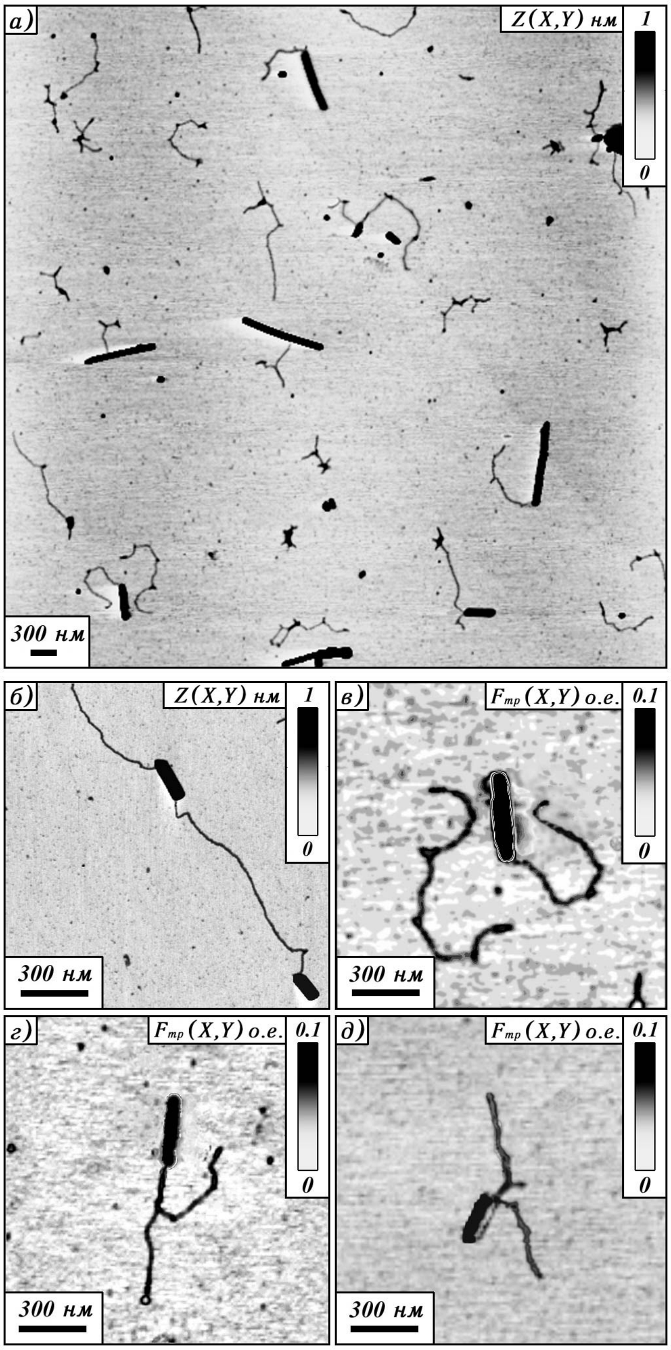


Рис. 3.4. Частицы вируса табачной мозаики, частично депротеинизованные обработкой 72% диметилсульфоксидом.

Наблюдаются белковые остовы с выходящими из них нитями РНК. Частицы адсорбированы на свежий скол слюды из 32% диметилсульфоксида; приведены АСМ-изображения, полученные в топографическом режиме $Z(X, Y)$ и в режиме измерения сил трения $F_{mp}(X, Y)$

приготовления образцов, и наблюдая идентичные протяженные нити (но уже без вирусных остовов, см. рис. 3.5), мы также отождествляли их с молекулами вирусной РНК (полностью освобожденными от белковой оболочки).

Наблюдение вирусных остовов с двумя нитями РНК, выходящими из одного конца вирусной частицы, может объясняться лишь процессом частичного их восстановления после того, как экспозиция с целью разрушения была завершена. Действительно, согласно работе [87], только в результате *самосборки* вирусной частицы возможно наблюдение двух нитей РНК, выходящих из вирусной частицы с одного конца, что связано с особенностью процесса самоорганизации вирусной частицы. Процесс самосборки вирусных частиц мог протекать только *до* разделения компонент препарата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, поскольку в процессе этой обработки молекулы белковой оболочки, молекулы свободной РНК и частично разрушенные вирусные структуры разделялись на отдельные фракции, что исключало возможность восстановления разрушенных вирусных частиц.

Атомно-силовая микроскопия молекул вирусной РНК ВТМ

На заключительной стадии обработки вирусных частиц белковая оболочка разрушается, и макромолекула РНК полностью высвобождается. На рис. 3.5 приведены типичные результаты АСМ-исследования свободных РНК, адсорбированных на подложку из слюды.

Молекулы, изображенные на рис. 3.5а и б, отделены от частично разрушенных вирусных частиц и молекул белковой оболочки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и адсорбированы на свежий скол слюды из 36% ДМСО; именно присутствие денатурирующего ДМСО способствует расправлению молекул.

Мы протестировали ряд методик модификации слюды до нанесения препарата: обработка в течении 75 мин 100 мМ $MgCl_2$, 150 мМ KCl, 100 мМ $MgCl_2$ + 150 мМ KCl; обработка 1% раствором ВАС в формамиде или APTES (2 часа при 105°C), см. раздел 1.5.1. Было обнаружено, что методика с использованием $MgCl_2$ приводит к *компактизации* молекул ДНК, адсорбируемых на подложке. Оптимальной, по-видимому, является методика с применением ВАС; при этом хорошие результа-

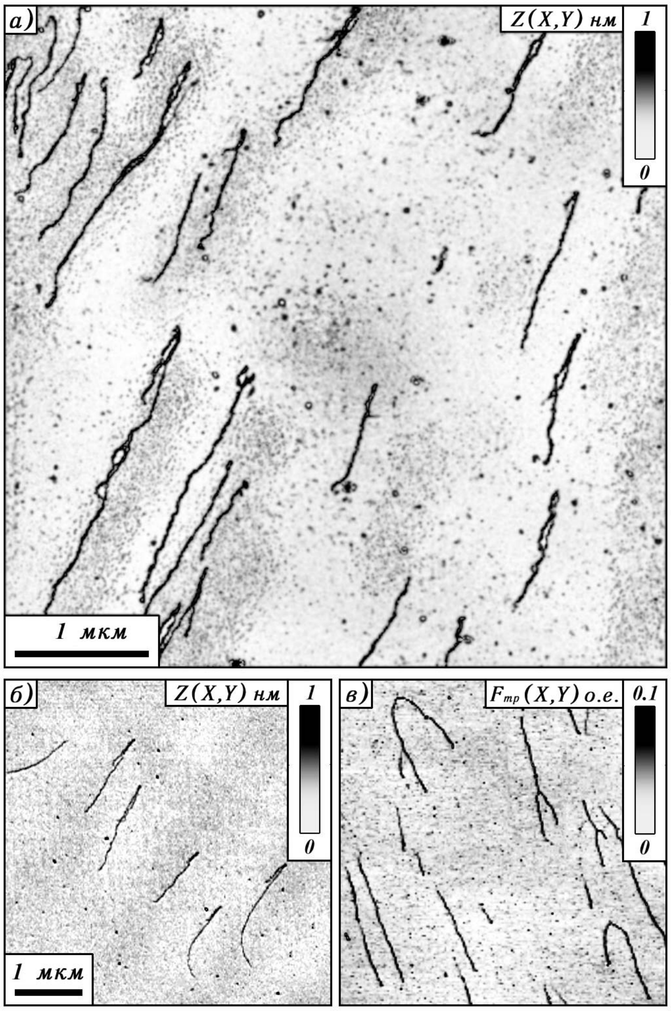


Рис. 3.5. Молекулы РНК ВТМ, полностью высвобожденные из белковой оболочки в результате обработки ДМСО;

а) и б) — молекулы РНК, высвобожденные обработкой 72% ДМСО, отделены от частично разрушенных структур и белковых молекул методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и адсорбированы на свежий скол слюды из 36% раствора ДМСО, в) — молекулы РНК высвобождены из белковой оболочки и денатурированы обработкой 50% ДМСО и 3,7% формальдегидом; адсорбированы на свежий скол слюды в присутствии 1% ВАС ты были получены и в случае, когда использовали свежий скол слюды, а ВАС (конечная концентрация 0,01–1%) добавляли непосредственно к препарату, содержащему исследуемые макромолекулы. Таким образом, именно присутствие ВАС способствует иммобилизации молекул на подложке.

Молекулы, изображенные на рис. 3.5в, также иммобилизованы на поверхности свежего скола слюды в присутствии 1% ВАС; методика приготовления препарата не включала в этом случае разделение его на фракции, поэтому для предотвращения самосборки частиц ВТМ молекулы РНК денатурировали обработкой 3,7% формальдегидом (см. описание экспериментальных методик со стр. 98).

Экспериментальный анализ ширины макромолекул РНК, адсорбированных на слюду, дает значения $10 \div 15$ и $20 \div 30$ нм для режимов прерывистого и постоянного контактов соответственно. Анализ значений высот макромолекул показал, что эти величины достаточно сильно варьируют как для различных молекул, так и для различных участков одной и той же молекулы, и заключены в диапазоне $0{,}3 \div 1{,}5$ нм (для исследований как в режиме постоянного, так и прерывистого контактов). Данный разброс может объясняться сохранением макромолекулой элементов вторичной структуры (неполное разворачивание на поверхности подложки, наличие скрученных участков).

О частичном сохранении элементов вторичной структуры макромолекул говорит также наличие петель и «шпилек». Расправлению макромолекул может способствовать влияние потока при высыхании капли препарата (см. рис. 3.5). Это влияние обусловлено силами, действующими со стороны высыхающей капли, на молекулы, прикрепленные к подложке. Природа этих сил может быть гидродинамической или электростатической: действительно, капля препарата, находящаяся на поверхности слюды, обогащена ионами K^+, перешедшими в раствор при частичной диссоциации слюды, поверхность молекулы РНК заряжена отрицательно. При высыхании капли концентрация катионов K^+ увеличивается, что может вызвать электростатическое взаимодействие капли с молекулой РНК и объяснять их наблюдаемую ориентацию.

При этом на АСМ-изображении четко идентифицируются участки прикрепления макромолекулы к подложке. Видно, что молекула, будучи закрепленной в данной точке, ориентируется, расправляясь по потоку.

Стабилизация макромолекул на поверхности подложки в расправленном состоянии позволяет провести анализ распределения макромолекул РНК *по длинам*. В то же время, если силы воздействия на молекулы значительны, то это может приводить к их разрыву, что способно затруднить интерпретацию получаемых распределений РНК по длинам, см. ниже.

Воспользуемся подходом, разработанным в разделе 2.2, для оценки эффекта уширения применительно к исследованию молекул РНК. С помощью программы, приведенной на стр. 223, можно восстановить истинную ширину объекта по измеренным полуширине его АСМ-профиля и высоте. Для измеренных параметров высоты профиля РНК над подложкой ($0{,}3 \div 1{,}5$ нм) и полуширины профиля на полувысоте ($10 \div 15$ нм для режима прерывистого контакта и $20 \div 30$ нм для режима контакта) получим восстановленные значения ширины объектов: $6 \div 14$ нм для режима прерывистого контакта и $16 \div 28$ нм для режима контакта. Если подсчитать, сколько молекул РНК ($N = S_{об}/S_{РНК} = ab/r^2$) может уместиться в этот «восстановленный» объект, то (используя для радиуса РНК $r = 1$ нм) получим цифры: $0{,}7 \div 4$ шт для режима прерывистого контакта и $1 \div 100$ шт для режима контакта. Таким образом, если для режима прерывистого контакта мы получили вполне разумную оценку, то оценка, проведенная по результатам измерений в режиме контакта, свидетельствует о существенном влиянии в этом случае дополнительных механизмов уширения, вклад которых не учитывает теория, разработанная в разделе 2.2. Представляется, что основная роль в этом дополнительном вкладе приходится на долю эффекта увлечения объекта зондом в процессе сканирования.

3.1.2. Анализ распределения молекул РНК по длинам

Длины свободных молекул РНК ВТМ

На рисунке 3.6 представлена гистограмма распределения по длинам молекул РНК, высвобожденных из белковой оболочки посредством *обработки ДМСО*. Характер распределения одинаков как для молекул, адсорбированных из 36% ДМСО после разделения на фракции методом хроматографии, так и для молекул, адсорбированных в присутствии 1% ВАС и денатурированных 3,7% формальдегидом (в обоих случаях адсорбция осуществлялась на свежий скол слюды). Из рисунка видно, что гистограмма распределения может быть описана суперпозицией трех гауссовых распределений[5], характеризующихся значениями средней длины молекулы $\bar{l}$: 0,7 мкм, 1,4 мкм и 2,0 мкм. Значения ширины соответствующих распределений: 0,5 мкм, 0,3 мкм и 0,7 мкм соответственно.

Мы связываем со значением длины расправленных[6] молекул РНК пик, имеющий значение 2,0 мкм. Действительно, механизм завышения значений длины молекул РНК может быть связан лишь с их межмолекулярной агрегацией. В случае если молекулы агрегируют «торец в торец», результатом будет возникновение второго пика в распределении на величине удвоенной длины молекул, что вряд ли может иметь отношение к нашему случаю. Вероятность специфической агрегации молекул, приводящей к возникновению вторичного пика на значении 2,0 мкм (если считать за родительский пик со средним значением 1,4 мкм), на наш взгляд невелика. Мы считаем, что за родительский следует считать именно пик со средним значением 2,0 мкм, а наличие двух дочерних пиков может объясняться недоразворачиванием молекул в процессе обработки (три возможных состояния молекулы с различной величиной межнуклеотидной связи), сохранением элементов вторичной структуры, либо разрывом молекул силами воздействия со стороны высыхающей капли препарата. Действительно, в отличие от традиционного для ЭМ метода Кляйншмидта (комплексообразование РНК с белковой пленкой и последующее нанесение комплекса на подложку, см. раздел 1.5.1), используемый нами подход в существенно меньшей степени «защищает» молекулы от деструктивного влияния сил, возникающих при высыхании капли. Интересно отметить, что значение двух дочерних пиков (0,7 и 1,4 мкм) соответствует величинам $1/3$ и $2/3$ от родительского максимума 2,0 мкм.

Итак, мы считаем, что значение длины расправленных молекул РНК в описываемых условиях эксперимента составляет 2,0 мкм. Это подтверждается также следующими наблюдениями.

---

[5] пунктирными линиями показаны соответствующие аппроксимирующие распределения, сплошной линией их сумма

[6] обработкой ДМСО

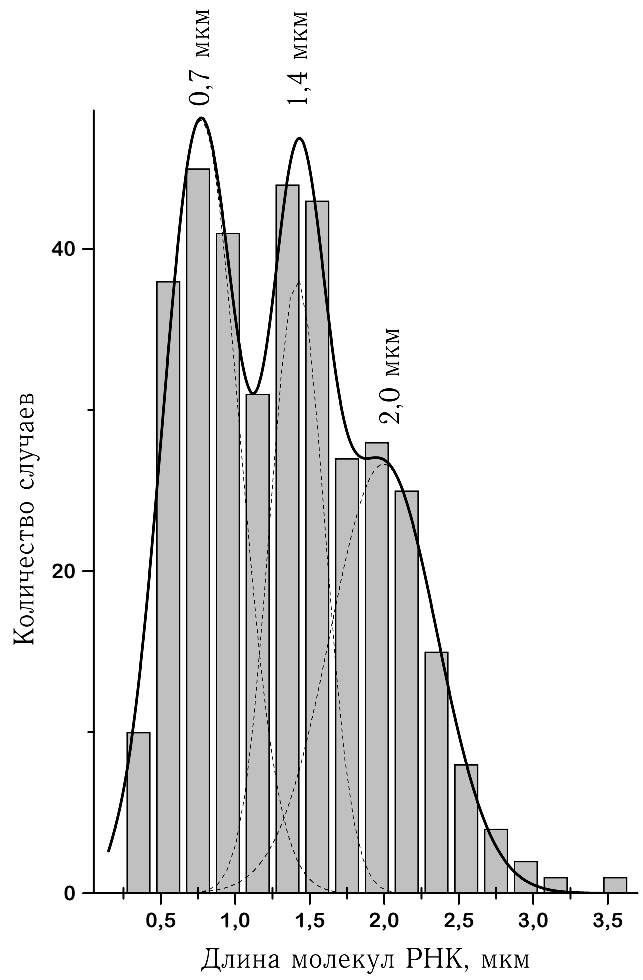


Рис. 3.6. Гистограмма распределения по длинам молекул РНК ВТМ, полностью высвобожденных из белковой оболочки под действием ДМСО, см. рис.3.5.

Сплошной линией показано аппроксимирующее распределение, являющееся суперпозицией трех гауссовых распределений (показаны пунктиром) со значениями максимумов 0,7, 1,4 и 2,0 мкм

Длины частично высвобожденных молекул РНК ВТМ

Мы проводили анализ распределения по длинам частично высвобожденных концов молекул РНК для вирусных частиц, находящихся на промежуточной стадии разрушения. Было обнаружено, что в 40% случаев у вирусной частицы наблюдается две нити частично высвобожденной РНК (в остальных случаях — одна нить). Иногда обе нити наблюдаются выходящими из одного конца вирусной частицы, что может объясняться лишь процессом частичного *восстановления* [87] вирусной частицы после завершения обработки с целью разрушения (процесс разрушения ДМСО завершали понижением концентрации этого реагента с 72 до 36%, аналогично разрушение мочевиной завершалось при понижении ее концентрации с 4 до 1,6 М).

Мы обнаружили определенную корреляцию между длиной вирусной частицы и длиной высвобожденной РНК, см. рис. 3.7 и 3.8.

Экспериментальные данные, приведенные на рис. 3.7 и 3.8, характеризуются значительным разбросом. Это, возможно, связано с частичным сохранением молекулами вторичной структуры, с межмолекулярной агрегацией, а также с тем, что длины полностью высвобожденных молекул РНК также характеризуются достаточно широким распределением, см. рис. 3.6. Тем не менее, измеренные экспериментальные значения длин частично высвобожденных молекул РНК допускают статистический анализ для оценки характера зависимости длины свободных концов РНК от длины вирусного остова.

Статистический анализ экспериментальных данных позволил установить, что для длины высвобожденной РНК в том случае, когда у вирусной частицы наблюдается одна выходящая нить, и в том случае, когда рассматривается большая из двух нитей, наблюдается обратная линейная зависимость длины высвобожденного участка РНК от длины вирусного остова. Для меньшей из двух нитей (в случае, когда их две) мы имеем также линейную зависимость, но существенно менее выраженную. В сравнении с длиной большей нити длину меньшей можно считать фактически постоянной, не зависящей от длины вирусного остова. В случаях, когда наблюдается единственная нить РНК, характер зависимости ее длины от длины вирусного остова *идентичен* аналогичной зависимости для большей нити в случае, когда их две. Поэтому мы считаем ве-

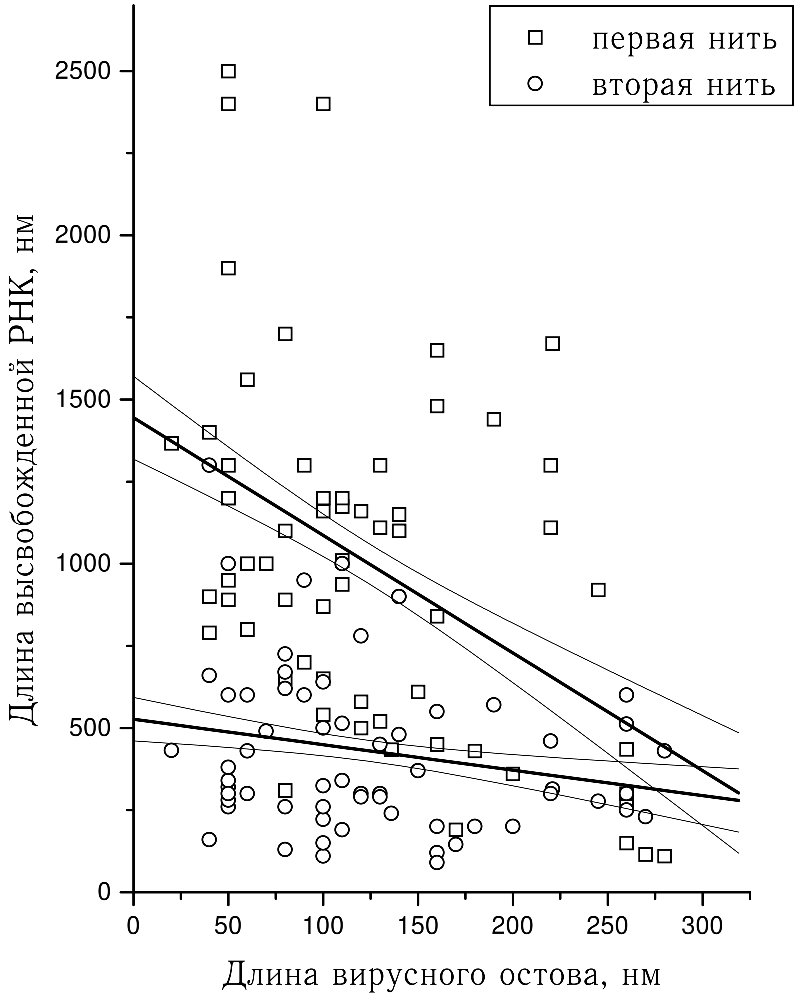


Рис. 3.7. Зависимости длины высвобожденной РНК ВТМ от длины вирусного остатка; случай двух нитей, выходящих из концов частицы.

Статистическая обработка результатов измерения зависимости длин высвобожденной РНК ВТМ от длины вирусного остатка в случае, когда наблюдаются две нити РНК, выходящие из разрушенной частицы; указаны аппроксимирующие прямые для каждой нити РНК и интервалы стандартных ошибок.

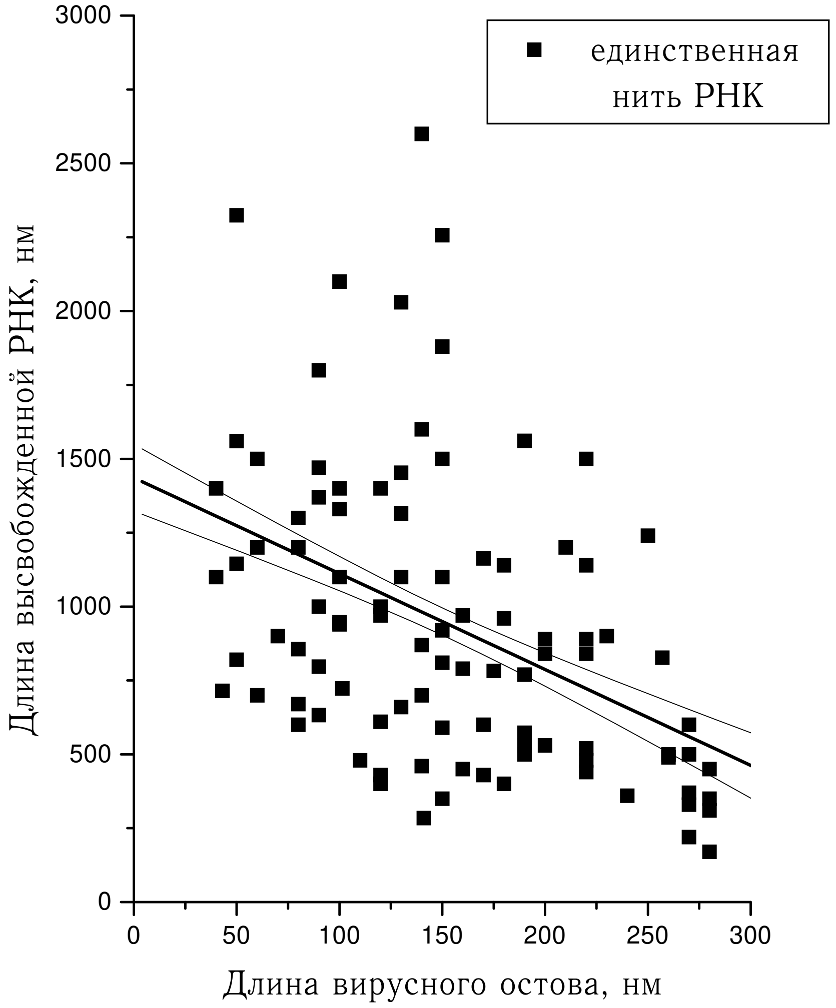


Рис. 3.8. Зависимость длины высвобожденной РНК ВТМ от длины вирусного остатка; случай одной нити, выходящей из конца частицы.

Статистическая обработка результатов измерения зависимости длины высвобожденной РНК ВТМ от длины вирусного остатка в случае, когда наблюдается единственная нить РНК, выходящая из разрушенной частицы; указана аппроксимирующая прямая и интервал стандартной ошибки.

роятным, что наблюдение только одного «хвоста» в 60% случаев может быть связано с тем, что второй «хвост»[7)] в этом случае располагается или вдоль вирусной частицы, или внутри ее, что не позволяет визуализовать его с помощью сканирующего микроскопа.

По результатам наблюдений можно сделать вывод, что процесс высвобождения вирусной РНК из белковой оболочки характеризуется асимметрией для двух концов вирусной РНК, таким образом, нами подтвержден механизм полярного разрушения вирусных частиц табачной мозаики[8)]. В то время как, с уменьшением длины вирусной частицы, длина одной высвобожденной нити растет до значения $1{,}44 \pm 0{,}13$ мкм, длина второй нити остается фактически постоянной на уровне $0{,}53 \pm 0{,}07$ мкм (стандартные ошибки определены аппроксимацией экспериментальных зависимостей по методу наименьших квадратов, см. рис. 3.7 и 3.8). Стоит отметить, что сумма экстраполяционных значений для обоих нитей при нулевой длине вирусной частицы составляет величину $1{,}97 \pm 0{,}15$ мкм, что совпадает с родительским пиком распределения свободных РНК по длинам, см. рис. 3.6. Это подтверждает справедливость приведенных выше рассуждений об оправданности идентификации именно пика со значением 2 мкм с длиной полностью расправленных молекул РНК. Поскольку РНК исследуемого штамма U1 включает около 6400 нуклеотидов, приведенные оценки позволяют оценить величину межнуклеотидной связи в молекуле РНК, обработанной и иммобилизованной на подложку слюды по описанной методике: $l_{н/н} = 0{,}31 \pm 0{,}02$ нм.

Исследование РНК вируса энцефаломиокардита мышей

С целью проверки универсальности апробированной при визуализации РНК ВТМ методики иммобилизации молекул на подложке с применением ВАС, мы провели сходные исследования РНК вируса энцефаломиокардита (ВЭМК) мышей. Молекулы РНК, выделенные из препарата вируса, были денатурированы обработкой 7,5% формальдегидом в течение 15 мин при 55°C и адсорбированы на свежий скол слюды в присутствии 0,01 и 0,05% ВАС, описание экспериментальных методик см. со стр. 98.

[7)] мы считаем, что он также присутствует

[8)] асимметрия процесса разрушения частиц ВТМ впервые обнаружена по данным ЭМ [83] с применением методики Кляйншмидта препарирования образцов; мы визуализировали свободные молекулы РНК (без белковой «шубы»)

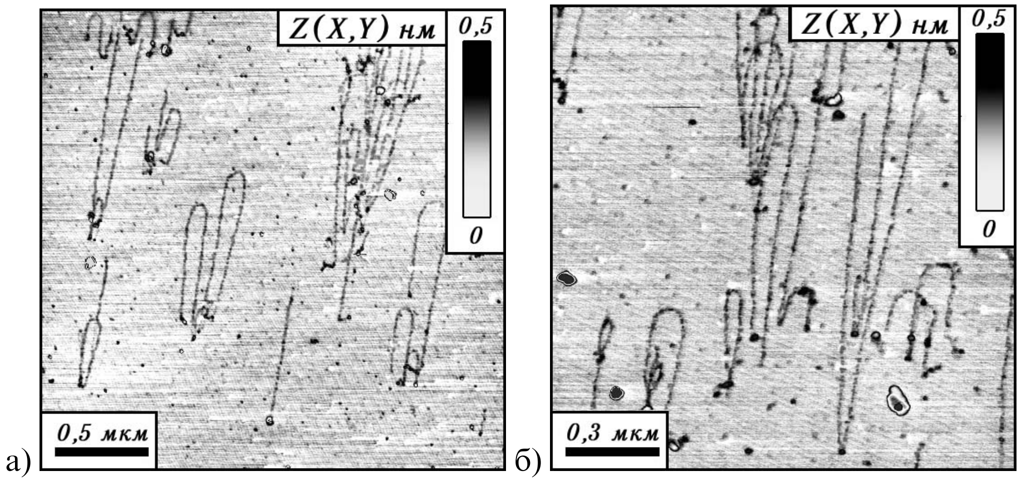


Рис. 3.9. Молекулы РНК вируса энцефаломиокардита мышей.

Молекулы денатурированы обработкой 7,5% формальдегидом и адсорбированы на поверхность свежего скола слюды в присутствии 0,01 и 0,05% ВАС; АСМ-исследование, режим прерывистого контакта

Применение данного алгоритма позволило визуализировать молекулы исследуемой РНК в расправленном состоянии, см. рис. 3.9.

Этот результат позволяет сделать вывод о возможность иммобилизации однонитевой высокомолекулярной вирусной РНК (при условии ее денатурации) на поверхности слюды в расправленном состоянии по методике с использованием ВАС; причем разработанный подход является, по-видимому, универсальным.

Возможность иммобилизации РНК ВЭМК мышей на подложке в расправленном состоянии позволил провести анализ распределения их по длинам, см. рис. 3.10. При этом обнаружено, что характер распределения не зависит от используемой концентрации ВАС (0,01 или 0,05%).

Обнаружено, что распределение РНК ВЭМК мышей по длинам, изображенное на рис. 3.10 характеризуется несколькими максимумами, как и распределение по длинам молекул РНК ВТМ, приготовленных по сходной методике, см. рис. 3.6. Поэтому можно предположить, что специфический характер распределений обусловлен именно используемой методикой приготовления образцов.

Разработка методик иммобилизации вирусной РНК на поверхности подложки имела своей целью отработку рутинного подхода к исследованию специфического РНК/белкового взаимодействия; к картированию

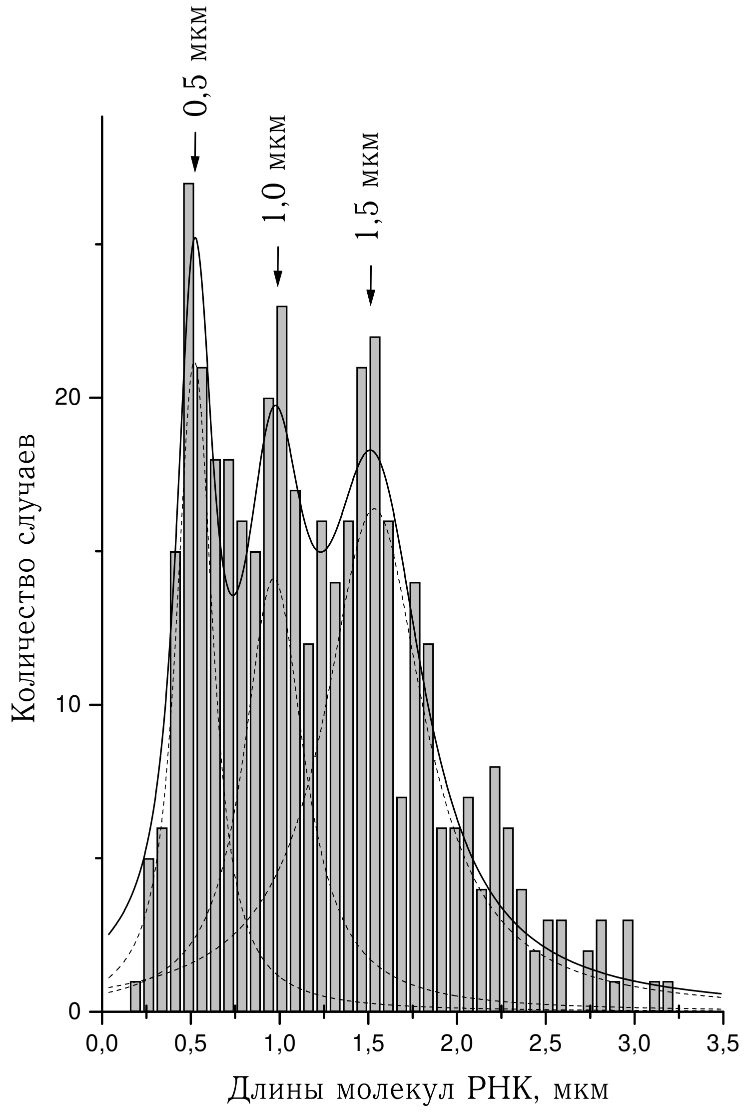


Рис. 3.10. Распределение молекул РНК вируса энцефаломиокардита мышей по длинам.

Молекулы адсорбированы на подложку слюды по методике, включающей присутствие в препарате 0,01 и 0,05% BAC; соответствующие АСМ-изображения молекул приведены на рис. 3.9. Сплошной линией показано аппроксимирующее распределение, являющееся суперпозицией трех гауссовых распределений (показаны пунктиром) со значениями максимумов 0,5, 1,0 и 1,5 мкм как данного взаимодействия, так и элементов вторичной структуры РНК с целью определения местоположения специфических последовательностей нуклеотидов. Тот факт, что молекулы РНК, иммобилизованные на подложке по апробированной методике, характеризуются несколькими максимумами в распределении по длинам, может быть учтен при решении задачи картирования следующим образом. Если построенная карта будет характеризоваться также несколькими максимумами, то это будет свидетельствовать о разной длине межнуклеотидной связи молекул, адсорбированных на подложке по используемой методике. В этом случае для определения адекватного местоположения исследуемой специфической последовательности нуклеотидов каждый максимум для расстояния от конца молекулы до специфического участка должен быть нормирован на соответствующий максимум для полной длины молекулы. Если же построенная карта будет характеризоваться единственным максимумом, то его следует нормировать на величину родительского максимума распределения молекул по длинам.

3.1.3. Краткие выводы

Мы исследовали процесс последовательного высвобождения вирусной РНК из белковой оболочки частиц ВТМ. Были визуализованы различные стадии процесса разрушения ВТМ и отработана методика иммобилизации высокомолекулярной однонитевой вирусной РНК на поверхности подложки. Статистический анализ зависимости длины высвобожденной РНК ВТМ от длины вирусного остова позволил подтвердить методом АСМ асимметрию процесса разрушения вирусных частиц относительно двух концов РНК ВТМ. Этот анализ, в совокупности с анализом распределения по длинам полностью высвобожденных молекул РНК, позволил сделать вывод о длине межнуклеотидной связи, характеризующей молекулу РНК ВТМ, обработанной и иммобилизованной на подложке по используемой методике препарирования образцов (без комплексообразования с белковой пленкой).

Апробированная методика иммобилизации позволила визуализировать и молекулы РНК вируса энцефаломиокардита мышей, что подтверждает универсальность разработанного подхода. Характер распределения по длинам этих молекул совпадает с характером распределения для молекул РНК вируса табачной мозаики, иммобилизованных на подложке по той же методике. Сделан вывод, что специфика наблюдаемых распределений обусловлена именно используемой методикой приготовления образцов; при этом специфичность распределения может быть учтена при потенциальном использовании апробированной методики иммобилизации РНК для решения задачи картирования РНК/белкового взаимодействия.

Таким образом, выполненная работа доказывает адекватность и перспективность применения метода АСМ для исследования и картирования процессов взаимодействия молекул нуклеиновых кислот (высокомолекулярной однонитевой вирусной РНК) с белками. Подобные исследования могут дать вклад в понимание механизмов процесса сборки и размножения вирусов, структурной организации и функционирования рибонуклеопротеидов.

Глава 4

Зондовая микроскопия процессов конденсации ДНК

[1] Молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты является носителем генетической информации живых организмов (совокупности данных, необходимых для синтеза белков), которая «записана» в структуре молекулы в «четвертичном» (по числу нуклеотидов) коде. Согласно модели Уотсона и Крика [27] молекула ДНК представляет собой две нити, которые формируют двойную спираль, стабилизированную взаимодействием пар комплементарных нуклеодтидов (вторая нить образована нуклеотидами, комплементарными нуклеотидам первой нити).

В живой природе (внутри вирусов и клеток) молекула ДНК находится в существенно «компактизованном» состоянии, занимая объем на несколько порядков (до 10^6) меньший, чем объем молекулы ДНК в растворе[2]. Таким образом, именно компактная конформация (конформация «глобулы») является «естественной» для молекулы ДНК, хотя в лабораторных исследованиях чаще имеют дело с ДНК в растворах, т.е. расправленной (конформация «клубка»).

Перевод молекулы ДНК из развернутого в компактное (конденсированное) состояние может быть осуществлен и в лабораторных условиях посредством разнообразных конденсирующих агентов и пр.; структуру,

[1] Результаты, изложенные в данной главе, получены в ходе совместной работы с сотрудниками лаборатории полиэлектролитов и биополимеров кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ: к.х.н. О. А. Пышкиной и к.х.н. В. Г. Сергеевым; заведующий лабораторией член.-корр. РАН А. Б. Зезин

[2] в *хорошем* растворителе, в котором проявляется электростатическое отталкивание отдельных витков молекулы

образованную в результате конденсации ДНК в присутствии полимеров и солей, иногда называют psi-ДНК[3)] или ψ-ДНК [88]. Начало исследованию процессов компактизации ДНК было положено Лерманом [89], который методом седиментации обнаружил, что в разбавленных растворах ДНК, при увеличении концентрации нейтрального полимера (полиэтилен гликоля) и соли одновалентного металла (NaCl) выше некоторого порогового значения, формируются частицы высокой плотности.

Краткий обзор литературы

В настоящее время установлено, что конденсацию молекул ДНК, находящихся в водных растворах, способны вызвать различные мультивалентные катионы: спермидин$^{3+}$ [90], спермин$^{4+}$ [91, 92], катионные полипептиды: полилизин, гистоны [93], катионные ПАВ [94, 95]. Двух- (и более) валентные металлические катионы способствуют конденсации молекул ДНК, находящихся в водно-спиртовых (этанол, метанол, изопропанол) средах [96].

Структура компактизованной ДНК исследовалась различными методами (краткий обзор основных результатов приводится в работе Блюмфельда [97]) при этом непосредственная визуализация объектов исследования осуществлялась методами электронной [93, 98, 99], атомно-силовой [100, 101] и (с меньшим разрешением) флуоресцентной [94, 95, 102] микроскопии.

Результаты исследований показали [97], что двумя *основными* формами ψ-компактизованной молекулы являются *тороидальная* и *стержневая*. Для обеих форм сечение компактизованных структур, имеет, по-видимому, одно и то же значение (если структуры сформированы одинаковыми молекулами). Достаточно интригующим представляется то, что размер (радиус) тороидальной структуры *не зависит* от длины молекулы (если она лежит внутри диапазона 400–40000 п.о.) и определяется, по-видимому, *внутренними* механизмами процесса конденсации; типичные значения внешнего радиуса тороидальной частицы R_{out} лежат в диапазоне 35–90 нм [97]. Длинные молекулы ДНК образуют компактные структуры из одной молекулы, при этом удавалось наблюдать тороидальную геометрию компактной частицы для молекул, длина которых

[3)] *psi* расшифровывается как *Polymer and Salt Induced* не превышала 40000 п.о. Короткие ДНК формируют структуры, образованные в результате самоорганизации нескольких молекул, при этом *совсем* короткие молекулы (менее 150 п.о.), по-видимому, не могут быть компактизованы [103].

Метод электронной микроскопии, позволяя достигать высокого пространственного разрешения в латеральном направлении, дает значительную ошибку при определении высоты объекта[4)], если она сравнима с размером зерна напыления; это обстоятельство не позволяет с большой точностью определять объем исследуемых частиц (необходимый для анализа их количественного молекулярного состава) по результатам исследований ЭМ. Более того, при расчете объемов частиц компактизованной ДНК часто не задаются целью определить высоту структур над подложкой, полагая, что сечение объекта представляет собой окружность [97]; нам представляется, что такое предположение не всегда обосновано (см. результаты раздела 4.1.2, стр. 135).

Стоит также отметить, что специфика препарирования образцов для исследований ЭМ может искажать структуру объекта исследования.

Этого недостатка лишен метод флуоресцентной микроскопии, позволяющий проводить в реальном масштабе времени исследования компактизации молекул ДНК, находящихся в нативных условиях (в растворах с подходящим pH). Однако разрешающая способность метода ограничена пределом оптического микроскопа $\lambda/2$. Поэтому в качестве объектов исследования приходится выбирать достаточно большие молекулы ДНК (например, гигантскую ДНК Т4, которая включает 166 тыс. п.о.) [94, 95, 102].

Применение метода АСМ для исследований компактизации молекул ДНК представляется весьма перспективным, поскольку оказывается возможным проводить исследования в нативных или близких к нативным условиях, при этом, как было показано нами в разделе 2.2, геометрия исследуемых объектов может быть восстановлена путем анализа измеренных параметров их АСМ-изображений (высоты над подложкой и ширины на полувысоте). В то же время, разрешающая способность АСМ существенно выше, чем у метода флуоресцентной микроскопии и близка разрешающей способности ЭМ. Однако в настоящее время в литературе

[4)] по методу запыления под углом

имеется лишь незначительное число публикаций [100, 101], посвященных применению СЗМ для исследований процессов компактизации ДНК.

Авторы работы [100] исследовали *начальные* стадии конденсации плазмидной поли-А ДНК в результате ее взаимодействия со спермидином. Используемые концентрации спермидина были малыми (верхняя граница 150 мкМ) поскольку, как сообщают авторы, при больших концентрациях спермидин негативно влияет на возможность АСМ-визуализации исследуемых структур.

Эксперименты проводились на воздухе и адсорбция осуществлялась из капли препарата на поверхность свежего скола подложки (слюды). Авторы обнаружили, что при концентрации спермидина в диапазоне 7,5–15 мкМ отдельные участки ДНК образуют петли, радиус которых составляет величину около 20 нм. При больших концентрациях спермидина имеет место межмолекулярная агрегация ДНК, причем, в исследуемом диапазоне, с увеличением концентрации спермидина возрастают размеры агрегатов; специфическая форма этого класса структур оправдывает название «цветка», которое используют авторы для описания морфологии комплекса.

Авторы полагают, что наблюдаемые образования могут являться промежуточной стадией компактизации молекул в тороидальные структуры. Однако обращает на себя внимание специфическая *плоская геометрия* визуализованных образований: они характеризуются микронными значениями латерального размера при высоте всего 3–7 нм. Представляется, что в исследуемой системе весьма важен вклад влияния *подложки* на геометрию компактизованных комплексов, поэтому обнаруженная специфическая морфология может быть связана именно с тем, что изучаемая компактизация является, по сути, компактизацией *на поверхности* подложки; в этом случае естественно ожидать иной геометрии компактных структур, в сравнении с компактизацией *в объеме*.

Исследование свободных ДНК

При проведении обсуждаемых ниже исследований компактизации ДНК мы ставили контрольные эксперименты по визуализации свободных молекул, при этом использовали известные методики, разработанные для метода атомно-силовой микроскопии, см. раздел 1.5.1, стр. 39.

Наиболее широко используемым способом иммобилизации молекул ДНК на подложке в расправленном состоянии является метод добавления катионов металлов в рабочий раствор, содержащий нуклеиновые кислоты, с последующей адсорбцией капли препарата на поверхность слюды (свежий скол).

Типичные концентрации компонент в препарате, наносимом на поверхность слюды, выбирали в следующем диапазоне: концентрация ДНК около 0,5 мкМ$\times$п.о., концентрация $MgCl_2$ или $NiCl_2$ около 1 мМ. Каплю препарата объемом 0,5 мкл наносили на свежий скол слюды. На рис. 4.1а приведены результаты АСМ-исследования молекул ДНК бактериофага ФХ-174 (5386 п.о.), которые были адсорбированы на слюду по описанной методике в присутствии $NiCl_2$.

Другой метод фиксации макромолекул на подложке, который использовался нами в экспериментах, это добавление к рабочему раствору, содержащему ДНК, молекул катионных ПАВ в *малых* концентрациях (менее 0,1%), см. рис. 4.1б. Типичные концентрации ДНК в препарате выбирали в том же диапазоне, что и выше. По-видимому, в этом случае имеет место комплексообразование молекул ДНК с молекулами ПАВ, образующими тонкую пленку, покрывающую снаружи каплю препарата, наносимую на подложку. Этот экспериментальный подход эквивалентен изложенному в разделе 3.1, где для иммобилизации вирусной РНК применяли метод комплексообразования молекулы нуклеиновой кислоты с ВАС, также являющимся катионным ПАВ.

4.1. Исследование конформационных изменений ДНК при взаимодействии с поверхностно-активными веществами

Компактизация ДНК при взаимодействии с катионными ПАВ и прохождение комплексов ДНК-ПАВ через межфазную границу вода/малополярный органический растворитель может рассматриваться как отдаленная модель транспорта генетической информации в клетку [104].

Ранее процесс компактизации ДНК при взаимодействии с катионными ПАВ исследовался, в основном, лишь методом флуоресцентной

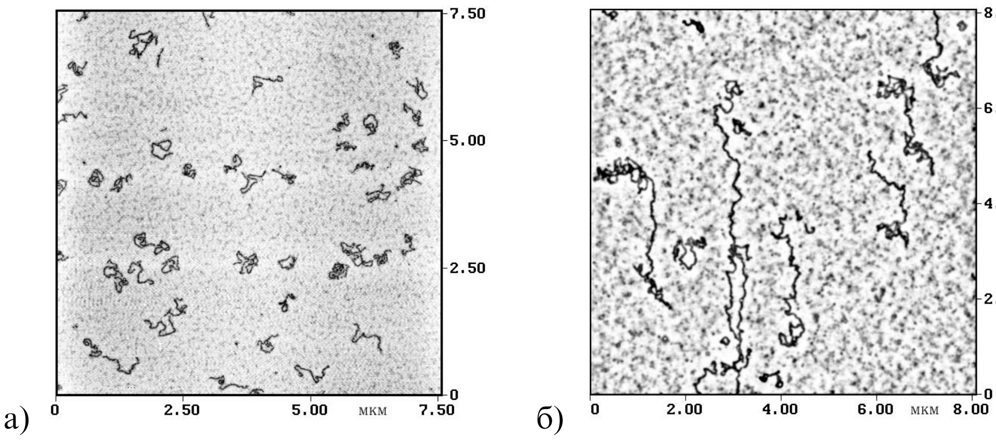


Рис. 4.1. Свободные молекулы ДНК на подложке из слюды.

а) ДНК бактериофага ФХ-174, адсорбция в присутствии 1 мМ $NiCl_2$; образцы приготовлены совместно с M. Sc. Malin Ardhammar (Chalmers University of Technology)
б) ДНК бактериофага T4, адсорбция в присутствии цетилтриметиламмоний бромида; образцы приготовлены совместно с к.х.н. В. Г. Сергеевым и к.х.н. О. А. Пышкиной

микроскопии (ФМ) [94, 95, 102]. Это объясняется тем, что данный метод позволяет визуализировать только те объекты, которые «окрашены» молекулами флуоресцентного красителя, поэтому вклад во флуоресцентное изображение дает лишь молекула ДНК (именно с ней связываются молекулы красителя), а присутствие в растворе молекул ПАВ не влияет на получаемое изображение. В этом отличие и преимущество[5] данного метода в сравнении с электронной и атомно-силовой микроскопией, для которых вопрос об адекватном распознавании и идентификации наблюдаемых структур может являться весьма нетривиальным. Этот аспект особенно существенен при исследованиях, связанных с молекулами ПАВ, в силу их способности к самоорганизации, в результате которой возможно формирование структур с различной геометрией [105].

Перед нами ставилась задача экспериментального определения оптимальных условий проведения исследований, которая решалась путем комплексного применения методов АСМ, СТМ, использования различных типов подложек (гидрофобных — пирографит, гидрофильных — слюда), а также вариацией условий нанесения образцов и проведения исследований.

[5] В то же время, недостатком метода ФМ является невысокая разрешающая способность.

При этом универсальная методика приготовления образцов, которая позволяла бы успешно исследовать как свободные молекулы ДНК, адсорбированные на подложку в расправленном состоянии, так и компактизованные комплексы, вряд ли может быть найдена. Поэтому в процессе исследования приходилось использовать методики «на конкретный случай».

Работы по исследованию взаимодействия ДНК-ПАВ мы проводили совместно с лабораторией член.-корр. РАН А. Б. Зезина (Химический факультет МГУ) и результаты зондовой микроскопии нашли частичное отражение в диссертации «Комплексы ДНК-ПАВ в малополярных органических растворителях» на соискание ученой степени к.х.н. О. А. Пышкиной (1997 г., Химический факультет МГУ). В этой работе приводятся данные широкого спектра физико-химических методов исследования (УФ-спектрофотометрия, скоростная седиментация, КД-спектрофотометрия, СТМ и АСМ, вискозиметрия, рефрактометрия, электрическое двулучепреломление, изотермическая диффузия). Результаты исследований зондовой микроскопии весьма хорошо согласуются с другими экспериментальными подходами.

В настоящей работе мы рассматриваем лишь два аспекта результатов исследований компактизации ДНК при взаимодействии с ПАВ[6)], которые не были затронуты в упомянутой работе:

- возможность визуализации комплексов ДНК-ПАВ методом сканирующей туннельной микроскопии;
- применение методики учета эффекта *уширения* (раздел 2.2) для восстановления реальной геометрии (и количественного молекулярного состава) комплексов ДНК-ПАВ по результатам исследования АСМ.

Более детальная информация о физико-химических свойствах и характеристиках комплексов ДНК с противоположно заряженными ПАВ (полученная применением широкого спектра исследовательских методик) может быть найдена в упомянутой диссертационной работе [104].

6) этому посвящен текущий раздел 4.1

4.1.1. Возможность исследования конформационных свойств комплексов ДНК-ПАВ методом СТМ

Согласно результатам исследований авторов работы [61] свободная молекула ДНК характеризуется невысокой проводимостью при исследовании СТМ, что выражается в визуализации молекулы по способу *отрицательного* контраста (т.е. при движении над макромолекулой, в силу диэлектрических свойств последней, сканирующая игла опускается ниже, чем при движении над подложкой). Несмотря на это, мы обнаружили при исследовании комплексов ДНК-ПАВ, что последние могут быть успешно визуализованы методом СТМ (по способу прямого контраста).

Экспериментальная часть

[7] В эксперименте использовали ДНК из эритроцитов цыплят («Союзхимреактив», Россия) 1000–3000 п.о. и дистеарилдиметиламмоний хлорид (ДСДАХ) («Tokyo Kasei Kogyo Co.», Япония).

Эксперименты проводили на СТМ СКАН-8 («Центр перспективных технологий», Россия) [106], в режиме постоянного тока (рабочие параметры: $U_t \sim 0{,}3$ В, $I_t \sim 0{,}5$ нА). АСМ-эксперименты проводили на приборе «Nanoscope-IIIa» («Digital Instruments», США) в режиме контакта с использованием кантилеверов из нитрида кремния (см. таблицу А.1, стр. 227).

Раствор ДНК (10^{-5} М) и ПАВ (9×10^{-5} М) в 0,5-М ТВЕ буфере объемом 2 мкл помещали на подложку (свежий скол пирографита или слюды) и высушивали в течение 3 мин. При нанесении комплексов из хлороформа их первоначально формировали в водной фазе при взаимодействии ДНК с ПАВ, затем комплексы высушивали и растворяли в хлороформе (в отличие от свободных молекул ДНК их комплексы с ПАВ растворимы в хлороформе [107]).

Анализ результатов

Было обнаружено, что комплексы ДНК-ПАВ могут быть визуализированы методом СТМ, см. рис. 4.2 а и б, где исследуемые объекты нанесе-

[7] Образцы для исследований были приготовлены совместно с к.х.н. О. А. Пышкиной и к.х.н. В. Г. Сергеевым (Химический факультет МГУ)

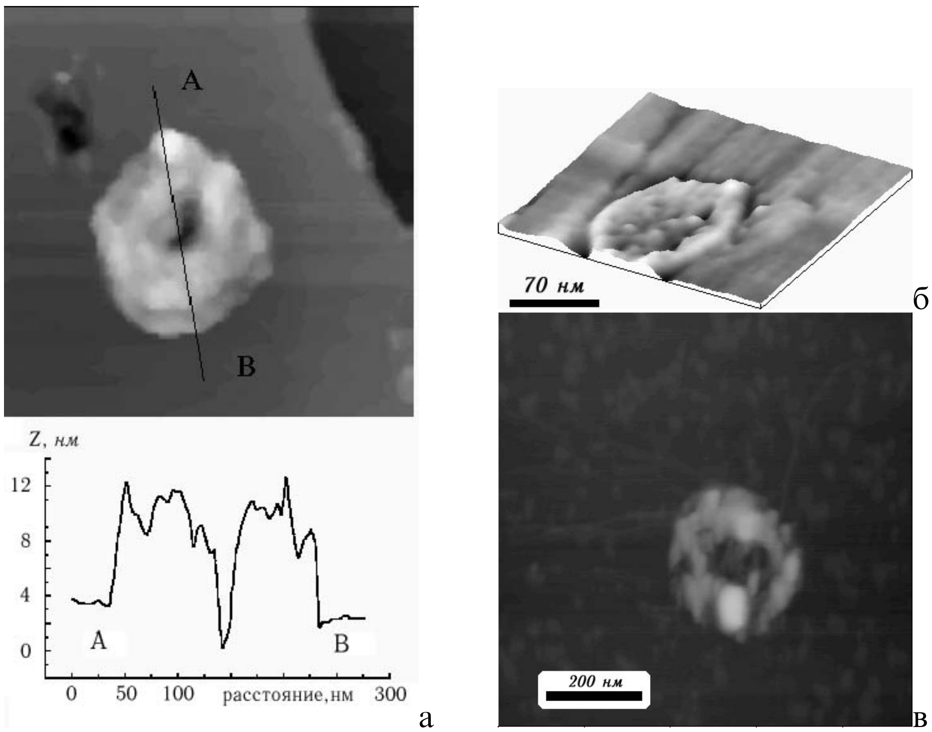


Рис. 4.2. Исследование комплексов ДНК-ПАВ методом СТМ и АСМ.

а — Комплексы адсорбированы из водной фазы на пирографит и визуализированы СТМ, (внизу изображено сечение СТМ-профиля комплекса);

б — комплексы адсорбированы из хлороформа на пирографит и визуализированы СТМ;

в — комплексы адсорбированы из водной фазы на слюду и визуализированы АСМ ны на подложку пирографита из водной фазы (а) и хлороформа (б). Для исключения эффекта влияния подложки и проверки адекватности применения метода СТМ к исследованию диэлектрических структур проводили контрольные измерения с помощью атомно-силового микроскопа. При этом были визуализованы объекты с идентичной морфологией (рис. 4.2 в).

Было обнаружено, что частицы комплекса ДНК-ПАВ хорошо адсорбируются на поверхность гидрофобной пирографитовой подложки из водной фазы, что может объясняться гидрофобным эффектом, см. стр. 21 (поверхность исследуемых комплексов характеризуется гидрофобными свойствами [104]). Методика нанесения частиц комплекса из хлороформа позволяет избежать агрегации исследуемых структур в процессе приготовления образцов. Это может быть связанно с тем, что в хлороформе гидрофобное взаимодействие отсутствует и агрегировавшие образования реассоциируют.

Можно предположить, что возможность визуализации таких объектов, как комплексы ДНК-ПАВ, методом СТМ связана с *поверхностной проводимостью* слоя молекул ПАВ, покрывающих комплекс снаружи. Это предположение согласуется с обнаруженной нами ранее (см. работу [108]) возможностью СТМ-визуализации бислойных липидных образований — липосом. Действительно, исследованные липосомы были образованы молекулами *липидов*, свойства и структура которых близки молекулам используемого ПАВ (ДСДАХ).

4.1.2. Определение геометрии комплексов ДНК-ПАВ, перешедших через границу раздела фаз вода/хлороформ, по результатам АСМ

В силу того, что комплексы ДНК-ПАВ нерастворимы в водной фазе, но растворимы в органических растворителях (хлороформе, гептане, циклогексане) [107], представлялось интересным провести исследование процесса их переноса через границу раздела фаз в органический растворитель и исследовать морфологию перешедших комплексов. Подобная система может служить модельной при изучении механизма трансмембранного переноса ДНК [104].

Знание геометрии компактизованных комплексов является весьма важным, например, для определения состава комплекса (количества образующих его молекул). Точность определения геометрии органического объекта по результатам исследований электронной микроскопии ограничена (трудно получить точную информацию о высоте объекта: методика запыления под углом дает значительную ошибку при малых высотах объекта).

Определение геометрии комплексов ДНК-ПАВ по результатам *относительных* методов исследования (см. раздел 1.4, стр. 33 и далее) осложнено в силу вариации комплексов по размерам.

Метод АСМ позволяет непосредственно определять форму и размеры отдельных объектов, адсорбированных на поверхность подложки, но для восстановления их *реальной* геометрии необходим дополнительный математический анализ (учет эффекта уширения, см. раздел 2.2 со стр. 85). Здесь мы применили разработанную в разделе 2.2 методику для определения формы комплексов ДНК-ПАВ, что позволило сделать выводы о количестве молекул ДНК, входящих в комплекс.

Экспериментальная часть

[8] Процесс переноса комплексов осуществляли из водной среды в хлороформ. В качестве ПАВ нами был выбран дистеарилдиметиламмоний хлорид (ДСДАХ) «Tokio Kasei Kogyo Co.», Япония. В работе использовали ДНК из спермы лосося («ГОСНИИОХТ» Россия) 300–500 п. о.

Свободные молекулы ДНК нерастворимы в хлороформе и могут быть переведены в органическую фазу только в виде комплексов с ПАВ (которые, как упоминалось, в хлороформе растворяются). Контроль процесса переноса комплексов ДНК-ПАВ через границу раздела фаз проводили методом УФ-спектрофотометрии на спектрофотометре «Specord M40» (Германия). Было показано[9], что при добавлении 1,5-кратного избытка ДСДАХ[10] к двухфазной системе, состоящей из вод-

[8] Образцы для исследований были приготовлены совместно с А. С. Андреевой и к.х.н. О. А. Пышкиной (Химический факультет МГУ)

[9] эти измерения были проведены А. С. Андреевой и к.х.н. О. А. Пышкиной (Химический факультет МГУ)

[10] т.е. при условии, что концентрация ПАВ в 1,5 раза превышает концентрацию ДНК

ного раствора ДНК и фазы хлороформа, наблюдается практически 100% перенос молекул ДНК в органическую фазу.

Адсорбцию образцов на слюду осуществляли стандартным образом: каплю препарата (хлороформ с комплексами после проведения 70% переноса) объемом 3 мкл помещали на свежий скол слюды, выдерживали в течение 3–5 минут, промывали бидистиллированной водой и высушивали на воздухе, после чего осуществляли сканирование.

АСМ исследования осуществляли на приборе «Nanoscope-IIIa» (Digital Instruments, США) в режиме контакта с кантилеверами из нитрида кремния жесткостью 0,06 Н/м.

АСМ-измерения геометрии комплексов ДНК-ПАВ

Методика нанесения комплексов ДНК-ПАВ на поверхность подложки из хлороформа, по-видимому, имеет следующие преимущества в сравнении с нанесением из водных растворов. Комплексы ДНК-ПАВ являются гидрофобными, и в водной среде могут взаимодействовать с силами притяжения за счет гидрофобного эффекта, что может привести к агрегации комплексов при приготовлении образцов и осложнить их АСМ-визуализацию. В хлороформе гидрофобные взаимодействия не проявляются, и перешедшие туда комплексы стабилизированы лишь внутренними механизмами конденсации ДНК, в силу чего каждый комплекс, по-видимому, состоит из молекул ДНК, покрытых *снаружи* слоем молекул ПАВ. Капля хлороформа, содержащая исследуемые комплексы, при нанесении на подложку высыхает достаточно быстро, что уменьшает вероятность образования регулярных структур вследствие механизмов агрегации или самоорганизации ПАВ.

С помощью АСМ было обнаружено, что при нанесении на подложку структур, оставшихся в водной фазы после проведения 70%-переноса[11)], на АСМ-изображениях присутствуют агрегаты молекул ДНК в виде нитей длины 250–2000 нм (изображения не приведены). Образование длинных тяжей происходит, по всей видимости, вследствие межмолекулярной агрегации отдельных молекул ДНК[12)]. Измерение значений высоты и ширины на полувысоте АСМ-изображений данных структур дает значение 0,3–0,9 нм и 13–25 нм соответственно.

[11)] т.е. в водной фазе остается 30% молекул ДНК

[12)] при воздействии ПАВ

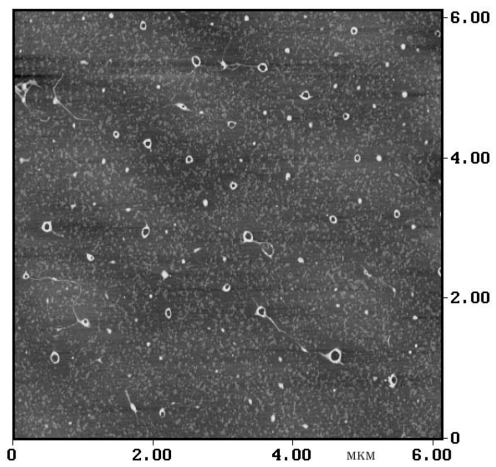


Рис. 4.3. Тороидальные комплексы ДНК-ПАВ, перешедшие в хлороформ из водной фазы и адсорбированные для АСМ исследования на поверхность слюды

На рис. 4.3 приведены результаты АСМ-исследования комплексов ДНК-ПАВ, перешедших в хлороформ, адсорбированных затем на свежий скол слюды и исследованных на воздухе. С целью анализа морфологии комплексов была проведена статистическая обработка измеренных параметров АСМ-изображений тороподобных структур: D — диаметра тора, d — диаметра сечения тора и h — высоты тороидальной структуры над подложкой.

Гистограммы распределения параметров тороидальных комплексов представлены на рис. 4.4, статистика набрана в результате измерения 180 АСМ-профилей комплексов, сплошной линией указана аппроксимация полученных распределений по закону распределения Гаусса.

Средние значения для параметров тора, определенные по аппроксимации распределением Гаусса, составляют следующие величины (в качестве погрешности указано стандартное отклонение):
$D = 100 \pm 30$ нм, $d = 25 \pm 9$ нм и $h = 5 \pm 2$ нм.
Т.о. параметры частиц (*внешний* радиус тора $R_{out} = (D + d)/2 = 62 \pm 16$ нм) хорошо согласуются с типичными значениями для молекул ДНК, имеющих различную длину и сконденсированных различными агентами [97].

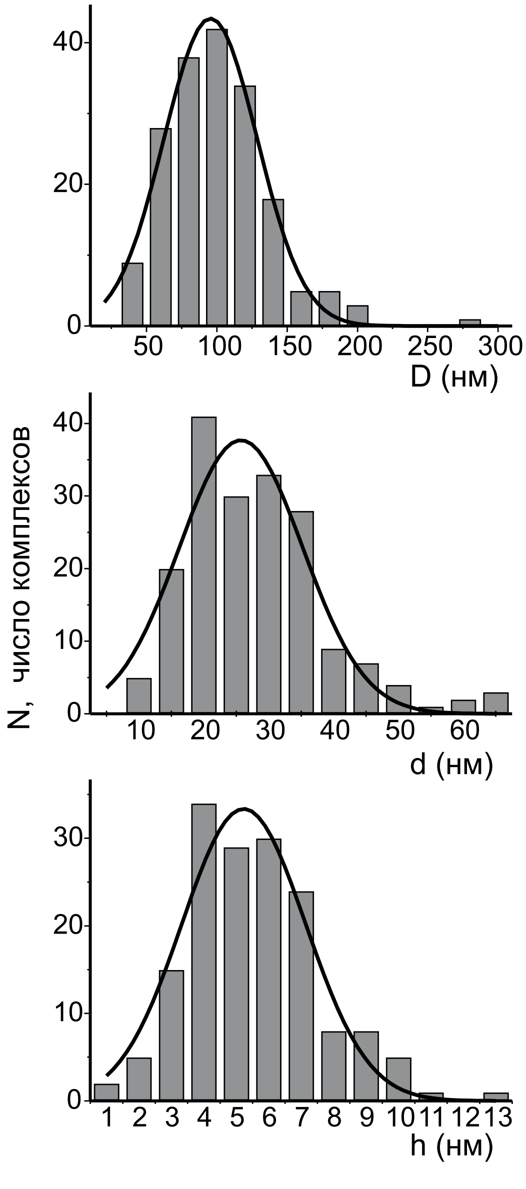


Рис. 4.4. Гистограммы распределения параметров геометрии АСМ-профилей тороидальных комплексов ДНК-ПАВ.

Измеряли геометрические параметры АСМ-изображений: диаметр тора, диаметр сечения тора и высоту над подложкой. Сплошной линией показана аппроксимация распределением Гаусса

Определение числа молекул ДНК, образующих комплекс с ПАВ, путем восстановления реальной геометрии компактных тороидальных структур

В силу того, что длина молекул лежит в диапазоне 100–170 нм, а средняя длина окружности тороидальной частицы πD составляет величину 300 нм, очевидно, что в образовании комплекса принимает участие, по крайней мере, две–три молекулы ДНК. Более подробный анализ требует восстановления реальной геометрии комплекса.

Занижение значений вертикальных размеров исследуемых структур обусловлено контактными деформациями под действием зонда, особенно существенными при исследовании объектов, радиус кривизны которых меньше радиуса кривизны кончика иглы, см. раздел 2.1. Предполагая, что деформация объекта не сопровождается изменением его объема, мы делаем вывод о том, что уменьшение высоты АСМ-изображения (занижение параметра $h = 2b$) будет скомпенсировано соответствующим увеличением его ширины (параметра d). Таким образом, мы делаем априорное предположение, что тороидальные комплексы ДНК-ПАВ имеют «сплюснутую» форму.

Завышение значений ширины АСМ-изображений является в основном следствием того, что кончик зондирующего острия имеет конечный радиус кривизны, см. раздел 2.2. Рассчитать вклад в уширение можно на основании анализа геометрии контакта исследуемой структуры и кончика зонда с помощью разработанной методики; текст программы, реализующей данный подход, приведен на стр. 220. Мы проводили анализ для моделей как параболической, так и сферической иглы. Полученные результаты для обоих подходов фактически тождественны: количественное расхождение в ответах составляет 3–9%.

Результаты применения методики учета эффекта уширения (раздел 2.2) к восстановлению ширины сечения исследуемых объектов. Геометрию кончика иглы (радиус кривизны или коэффициент параболы) можно определить при исследовании объектов, имеющих в сечении *окружность* известного радиуса[13]. Согласно результатам исследования тест-объектов (частиц вируса табачной мозаики, см. раздел 3.1) радиус кри-

[13] из элементарных геометрических построений, см. стр. 103

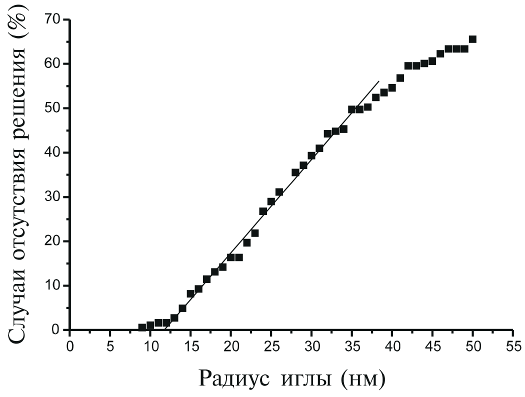


Рис. 4.5. Число случаев отсутствия решения в зависимости от радиуса аппроксимации иглы.

Проверка выполнимости «реперного» условия (2.38) стр. 90 для набранной статистики измеренных значений h и d АСМ-профилей тороидальных комплексов ДНК-ПАВ

визны кончика иглы кантилеверов используемого типа имеет величину от 5 до 15 нм (по данным фирмы-производителя до 40 нм, см. таблицу А.1). Для модели параболической иглы это соответствует вариации параметра k в диапазоне $(21{,}5–3{,}9) \times 10^{-2}$ нм$^{-1}$. Определение точного значения радиуса R (или k) для конкретного зонда требует его тестирования непосредственно перед использованием. Однако и в этом случае существует вероятность того, что в процессе сканирования форма иглы претерпит изменения в результате взаимодействия с объектом. В этой связи чрезвычайно полезным является получение информации о форме зонда непосредственно из АСМ-изображений объекта исследования. Эта информация может быть получена в разработанной методике учета эффекта уширения (раздел 2.2).

Так, на рис. 4.5 представлен график зависимости числа случаев отсутствия решения (для статистики пар значений d и h) от радиуса аппроксимации зонда, построенный путем тестирования выполнения «реперных» условий (2.38) или (2.39), см. стр. 90. На основании рис. 4.5 можно сделать вывод, что верхняя граница значения R, характеризующего используемый зонд, составляет 12 нм (соответствует $k = 5{,}5 \times 10^{-2}$ нм$^{-1}$) — выше этого значения наблюдается линейный рост числа случаев отсутствия решения. Нижняя граница для радиуса кривизны зонда определяется контактными деформациями.

Мы восстановили истинную ширину тороидальных структур, используя два различных значения R — 6 нм и 12 нм (соответствует k — $13{,}2 \times 10^{-2}$ нм$^{-1}$ и $5{,}5 \times 10^{-2}$ нм$^{-1}$). Среднее значение параметра a (найденное численно) для этих случаев составляет 11 и 10 нм соответственно (относительное отклонение $\varepsilon = 0{,}5$). Результаты применения параболической модели иглы дают значения 12 и 11 нм. Таким образом, действительно, формой комплекса ДНК-ПАВ является сплюснутый тор.

Мы подсчитали также количество молекул ДНК, входящих в состав протяженных тяжей, оставшихся в водной фазе после проведения процесса переноса (см. выше). Восстановив значение истинной ширины нити (для $R = 6$ нм получили $a = 5$–11 нм, для $R = 12$ нм — $a = 6$–12 нм) и обнаружили, что в сечении нити укладывается от 1 до 5 молекул ДНК. Т.о. используемая методика дает согласие с ожидаемыми значениями при применении ее к анализу ширины как одиночных молекул ДНК, так и их агрегатов.

Следует подчеркнуть, что методика не учитывает возможного дополнительного вклада в уширение, связанного с частичным увлечением образца зондом при сканировании, что может приводить к 1,5–2,5-кратному (по нашим оценкам) завышению значения ширины объекта d и, как следствие, восстанавливаемого значения a.

Расчет числа молекул ДНК, образующих комплекс с ПАВ. Предполагая плотную (гексагональную) упаковку молекул ДНК в комплексе, получим, что объем, приходящийся на одну молекулу в составе комплекса, имеет величину $4R^2 \sin 60^\circ L$, где R — радиус молекулы ДНК, а L — ее длина.

Объем тороидального комплекса будет определяться формулой $\pi^2 abD$, где a — найденное численное решение, $b = h/2$, D — диаметр тора. С учетом наличия слоя ПАВ толщиной l получим формулу для числа молекул:

$$N = \frac{\pi^2 abD}{2\sqrt{3}(R + l)^2 L}$$

На рис. 4.6 приведены гистограммы распределения найденных значений числа молекул при двух значениях параметра R (радиуса кривизны иглы) — 6 и 12 нм. (Модель параболической иглы дает фактически идентичные распределения).

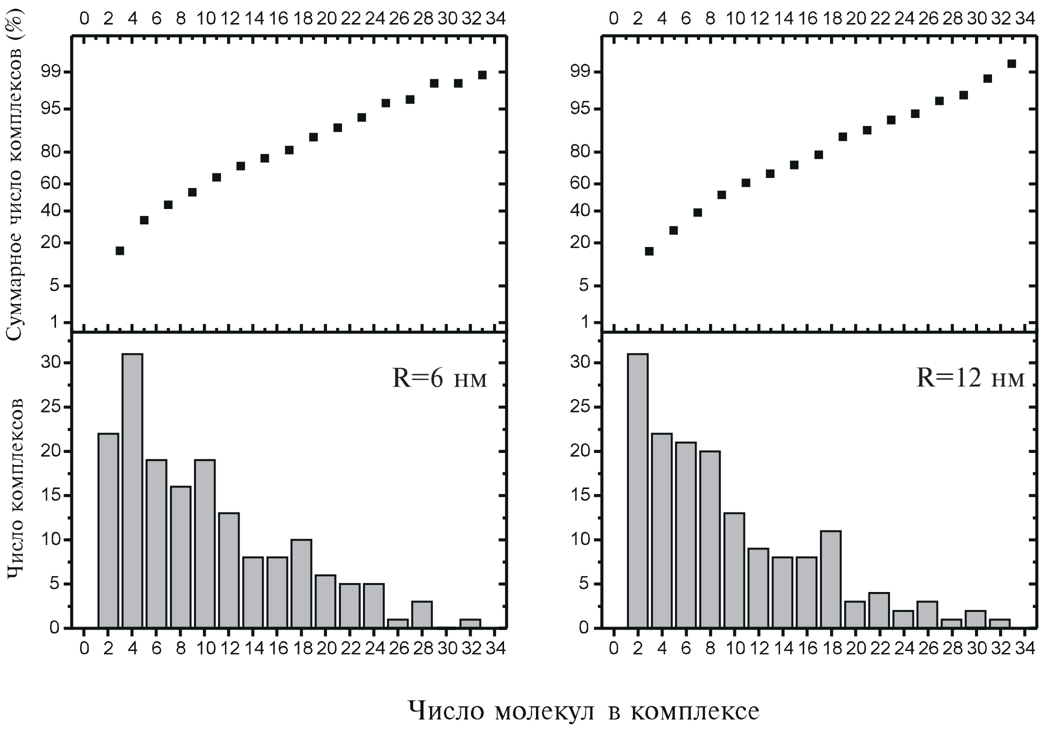


Рис. 4.6. Гистограммы распределения числа молекул ДНК, входящих в состав комплексов с ПАВ

Анализ гистограмм показывает, что, согласно полученному решению, 80% комплексов имеет в своем составе менее 16 молекул ДНК (при использовании аппроксимации $R = 6\,\text{нм}$) или 15 молекул (при $R = 12\,\text{нм}$).

Выводы. Мы показали, что в состав комплексов, нерастворимых в водной фазе, но растворимых в хлороформе, входит несколько молекул ДНК. Можно предположить, что в исследуемых структурах молекулы ДНК объединены непосредственно друг с другом и покрыты снаружи слоем ПАВ[14)]. Применение методики восстановления истинной геометрии объектов по результатам АСМ-измерений позволило сделать вывод, что в состав комплексов входит от 2 до 15 молекул.

[14)] поскольку комплекс, в котором объединены несколько молекул ДНК, каждая из которых покрыта снаружи слоем ПАВ, не будет стабильным в хлороформе (в отсутствие гидрофобных взаимодействий)

4.2. Исследование изменений конформации ДНК в водно-спиртовых средах

В разделе 4.1 мы рассматривали конформационные изменения, которые претерпевают молекулы ДНК при взаимодействии с молекулами ПАВ в водных растворах. Методом АСМ было подтверждено, что в этих условиях может происходить компактизация молекул ДНК, при этом была визуализирована тороидальная структура компактных комплексов.

Стоит отметить, что система ДНК + ПАВ достаточно сложна для исследований *прямыми* методами визуализации геометрии микрообъектов, к которым относится и АСМ. Действительно, присутствие ПАВ в качестве компонента системы требует проведения трудоемких контрольных экспериментов для определения методики приготовления образцов, при использовании которой структуры, образованные только ПАВ (без ДНК), не приводили бы к ошибкам в интерпретации АСМ-результатов. Это связано со способностью ПАВ к самоорганизации [109], которая, например, может иметь место в процессе высыхания капли препарата, нанесенной на поверхность подложки для приготовления образцов[15]. Поэтому необходимо определить такие условия процессов нанесения образцов, высушивания капли препарата и промывки, при которых наличие на подложке объектов, связанных лишь с самоорганизацией ПАВ (без участия ДНК), минимально. Или, если они и присутствуют, то их геометрия принципиально отличается от исследуемых комплексов ДНК-ПАВ: например, наличие на подложке самоорганизованных *плоских* моно- или мультислойных пленок ПАВ не осложняет идентификацию искомых ДНК-ПАВ комплексов, но, напротив, часто способствует иммоблизации исследуемых объектов в процессе сканирования[16].

Поэтому достаточно показательным было бы подтвердить адекватность применения СЗМ для исследования процессов конденсации ДНК на примере более простых систем. Таковой системой, на наш взгляд, может считаться молекула ДНК, находящаяся в водно-спиртовой среде

[15] при высыхании капли будет повышаться концентрация ПАВ

[16] формирование пленок ПАВ на поверхности слюды (отрицательно заряженной в водных растворах) может приводить либо к ее гидрофобизации, либо к смене знака поверхностного заряда — в зависимости от количества монослоев и ориентации молекул

(этанол, изопропанол). При достаточно высоких концентрациях спирт становится для молекул ДНК *плохим*[17] растворителем (в присутствии катионов Na^+ — обычно работают с натриевыми солями ДНК), что приводит к переходу макромолекул из состояния развернутого клубка в состояние компактной глобулы [110].

4.2.1. Исследование сконденсированных в водно-спиртовой среде молекул ДНК при проведении исследований на воздухе

[18] Эксперименты в естественной атмосфере осуществляли по следующей схеме. Молекулы ДНК конденсировали в водно-спиртовой среде при концентрациях спирта, приводящих к переходу клубок $\to$ глобула, и наносили каплю препарата[19] на подложку, затем образцы высушивали, промывали и снова высушивали, т.е. схема эксперимента была стандартной для исследований на воздухе и идентичной случаю анализа конденсации комплексов ДНК-ПАВ[20].

Для экспериментов выбрали ДНК из эритроцитов цыплят (1000–3000 п. о., «Союзхимреактив», Россия), в качестве спирта использовали изопропанол и этанол (х. ч.). Контрольные эксперименты по исследованию молекул ДНК, приготовленных нанесением из водного раствора буфера (без спирта), демонстрируют отсутствие компактизации макромолекул в данных условиях — рис. 4.7. Здесь мы использовали в качестве подложки *немодифицированную* слюду, поскольку такую же подложку выбирали и для конденсированных молекул. Использование немодифицированной (т.е. отрицательно заряженной) слюды в качестве подложки объясняет тот факт, что адсорбированные молекулы недостаточно расправлены и частично проагрегировали.

Добавление к исходному раствору 50% и более спирта (изопропанола или этанола) существенно влияет на конформацию ДНК. Результаты наших экспериментов показывают, что большая часть молекул находится в одной из двух типов конформаций — тороидальной или стержневой

[17] в смысле влияния на конформацию полимерной цепи

[18] Образцы для исследований были приготовлены совместно с к.х.н. О. А. Пышкиной

[19] брали осадок

[20] это позволяет провести сравнительный анализ

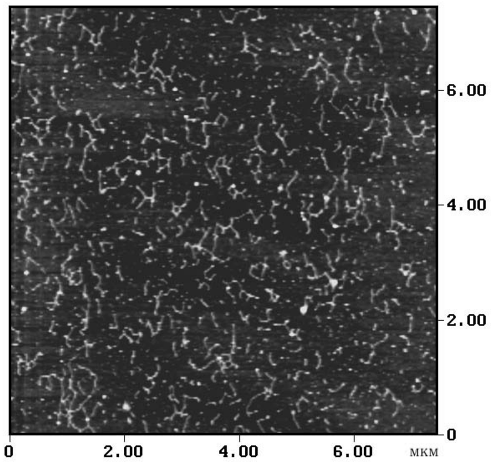


Рис. 4.7. Свободные молекулы ДНК, адсорбированные на поверхность свежего скола слюды из буфера.

Видно, что при этих условиях молекулы недостаточно расправлены и частично проагрегировали

(rod-like). Следует подчеркнуть, что при высокой концентрации молекул ДНК в исходном растворе тороидальные и стержневые частицы агрегируют в единую структуру. На рис. 4.8 представлен результат АСМ визуализации стержневой структуры ДНК, полученной при адсорбции макромолекул из 66% водного раствора этанола (концентрация ДНК составляла 5×10^{-5} М).

Анализ ширины профиля стержневых структур показывает, что они образованы, по крайней мере, несколькими молекулами ДНК («стянутыми в жгут»); высокая степень агрегации стержневых структур объясняется значительной концентрацией ДНК в рабочем растворе.

Несколько отличные результаты были получены при использовании в качестве спирта изопропанола. На рис. 4.9 представлены результаты АСМ-визуализации тороидальных структур, образованных молекулами ДНК при нанесении на поверхность слюды 4×10^{-7} М раствора ДНК в 50% изопропаноле (в присутствии 0,05 М TBE буфера). Результаты свидетельствуют, что в этом случае (в сравнении с этанолом) более часто наблюдаются тороподобные структуры, нежели стержневые. Причина может заключаться в различных значениях диэлектрических проницаемостей изопропанола ($\varepsilon = 18{,}3$) и этанола ($\varepsilon = 24{,}3$), что обеспечивает

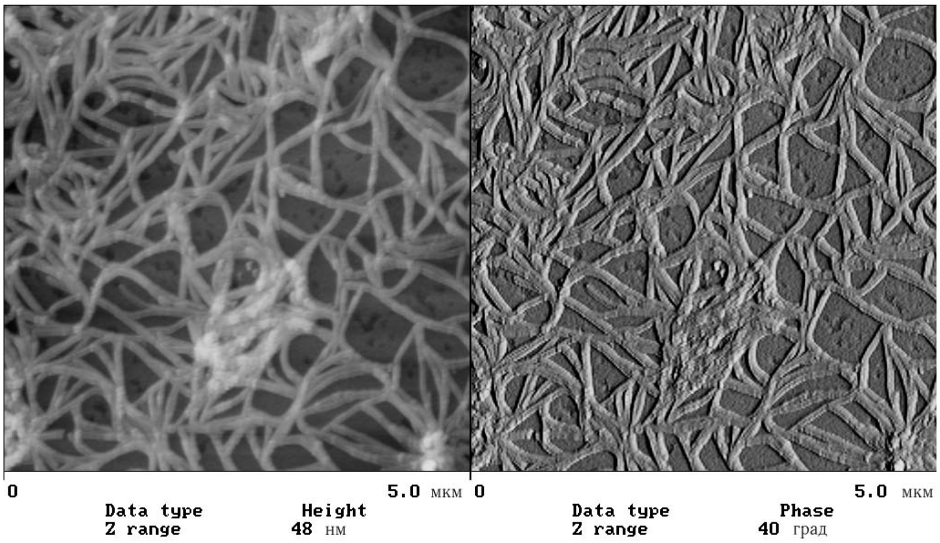


Рис. 4.8. Молекулы ДНК адсорбированы на поверхность свежего скола слюды из 66% водного раствора этанола.

$C_{ДНК} = 5 \times 10^{-5}$ М; АСМ-исследование в режиме прерывистого контакта, слева приведено топографическое изображение, справа — фазовое, см. раздел 1.3.2

лучшую компенсацию заряда поверхности макромолекулы противоионами Na^{+} в случае изопропанола.

Стоит подчеркнуть, что при проведении АСМ-исследований на воздухе неизбежной стадией приготовления образцов является процедура высушивания капли препарата на подложке. В процессе высушивания концентрации компонент препарата в капле неравновесно возрастают, что может неконтролируемо влиять на морфологию адсорбируемых на подложку структур. Исключить процедуру высушивания возможно при проведении АСМ-исследований в жидких средах.

4.2.2. Исследование процессов конденсации ДНК непосредственно в водно-спиртовой среде

В этой серии экспериментов мы проводили исследования конденсации молекул ДНК непосредственно в *жидкостной ячейке* АСМ, что позволяло исключить возможное негативное влияние процесса высушивания капли препарата в стандартной схеме экспериментов на воздухе (см. предыдущий раздел).

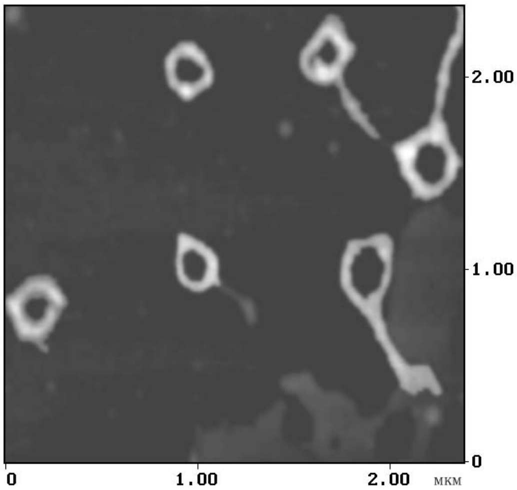


Рис. 4.9. Молекулы ДНК адсорбированы на поверхность свежего скола слюды из 50% водного раствора изопропанола.

Адсорбция в присутствии 0,05 M TBE буфера, $C_{ДНК} = 4 \times 10^{-7}$ M; АСМ-исследование в режиме контакта

Рассматриваемое осложняющее препятствие полностью отсутствует при проведении исследований в жидких средах, когда поверхность подложки и зонд микроскопа помещают в жидкостную ячейку, после чего ячейку заполняют рабочим раствором, содержащим объекты исследования. Иммобилизация изучаемых структур на подложке осуществляется лишь за счет процессов адсорбции из раствора.

В описываемой серии экспериментов мы использовали ДНК бактериофага T4 и водные растворы изопропанола и этанола. Ранее было показано [110], что гигантская ДНК T4 в водно-спиртовой смеси при концентрации спирта более 50% (для изопропанола) претерпевает конформационный переход клубок $\rightarrow$ глобула. При уменьшении концентрации спирта до 40% наблюдалось частичное разворачивание глобул. Динамика перехода исследовалась методом флуоресцентной микроскопии. Однако, в силу ограничения разрешающей способности метода (предел оптического микроскопа), оказалось трудным определить точную геометрию компактных глобул и структуру частично компактизованных образований.

Представлялось показательным провести АСМ-исследования процесса компактизации именно для этого объекта в тех же условиях.

Экспериментальная часть

[21] В качестве объектов исследования использовали ДНК бактериофага T4 («Nippone Gen», Япония), состоящей из 166 тыс. п.о. При проведении экспериментов использовали бидистиллированную воду, очищенную с помощью системы «Milli-Q» («Millipore», США). Водно-спиртовые среды готовили с использованием изопропанола (х. ч.).

Исследования конденсации молекул ДНК проводили методом атомно-силовой микроскопии в водно-спиртовой смеси с использованием подложек слюды. Свежий скол слюды и кантилевер (с зондом) помещали в жидкостную ячейку АСМ, которую последовательно заполняли рабочими растворами. Препарат, содержащий молекулы ДНК T4 в водно-спиртовой смеси при 80% концентрации спирта, получали, смешивая один объем раствора ДНК в 0,5-TBE-буфере с четырьмя объемами изопропанола. Препарат молекул ДНК в 40% изопропаноле получали, смешивая два объема раствора ДНК в буфере с тремя объемами изопропанола. В обоих случаях конечная концентрация ДНК в смеси составляла 1×10^{-6} М.

Эксперименты проводили в жидкостной ячейке АСМ «Nanoscope-III» (Digital Instruments, США) в режиме прерывистого контакта с использованием заостренных кантилеверов из нитрида кремния жесткостью 0,32 Н/м, см. таблицу А.1.

Определение адекватной методики проведения АСМ-эксперимента включало анализ наиболее подходящих концентраций водно-спиртовой смеси, а также последовательность заполнения жидкостной ячейки рабочими растворами (тестировали различные варианты).

В результате тестирования остановились на следующей методике:

- в жидкостную ячейку помещают кантилевер и *свежий скол* слюды, затем вводят водно-спиртовую смесь при той концентрации спирта, какая предполагается в используемом препарате с ДНК[22];

---

[21] Эксперименты были поставлены совместно с к.х.н. В. Г. Сергеевым

[22] некоторое время отводится на стабилизацию системы

- далее, начинают процесс сканирования для тестирования работы системы, а также контроля качества поверхности слюды и чистоты используемых растворов[23]);

- не прекращая процесс сканирования, в систему вводят препарат, содержащий молекулы ДНК в водно-спиртовой смеси. Конденсированные молекулы выпадают на поверхность подложки, что позволяет их визуализировать с помощью микроскопа.

Результаты и их обсуждение

Препарат, содержащий молекулы ДНК Т4 в водно-спиртовой смеси при 80% концентрации изопропанола, вводили в жидкостную ячейку, заполненную предварительно водно-спиртовой смесью с той же концентрацией спирта. При этих условиях макромолекулы ДНК осаждались на поверхность слюды в виде компактных глобул (рис. 4.10а и в).

Применение методики восстановления реальных размеров исследуемых объектов по измеренной высоте и ширине профиля АСМ-изображения (учет эффекта уширения), которая разработана в разделе 2.2, (см. стр. 85 и далее), позволяет определить объем глобулярных структур. Мы провели расчеты по разработанной методике учета эффекта *уширения* для двух значений радиуса кривизны иглы: 5 и 10 нм, результаты приведены в таблице 4.1. По нашим оценкам (с применением тест-объектов) радиус кривизны иглы, используемой при записи приведенных изображений, лежит именно в диапазоне $5 \div 10$ нм. Значения параметров глобулы, определенные с использованием двух граничных значений для радиуса кривизны иглы фактически идентичны. Восстановленные значения параметров полуосей a и b позволяют сделать вывод, что геометрической формой глобулы является *сплюснутый и слегка вытянутый эллипсоид*.

Стандартные отклонения величин, приведенных в таблице 4.1, велики, что объясняется статистическим разбросом измеряемых параметров для различных глобул[24]). Более наглядно это видно из анализа гистограмм распределения анализируемых параметров.

[23]) должна наблюдаться гладкая (на ангстремном уровне) поверхность слюды, без каких-либо поверхностных структур

[24]) а не погрешностью методики учета эффекта уширения

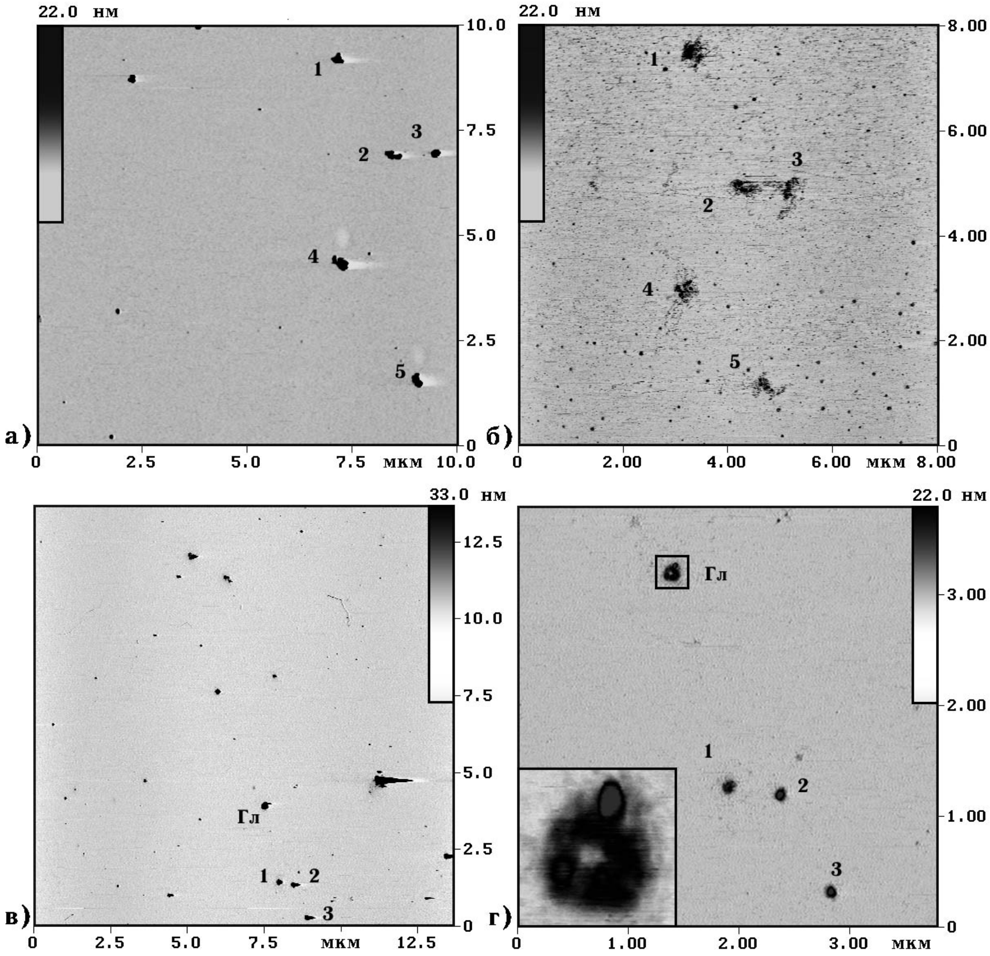


Рис. 4.10. Динамика процессов компактизации/декомпактизации молекул ДНК в водно-спиртовой среде:

а) и в) — компактные глобулы, выпавшие на поверхность слюды из 80% водного раствора изопропанола;

б) и г) — частично декомпактизованные глобулы (те же участки поверхности) после понижения концентрации спирта до 40–50%;

г), врезка — одна из глобул с большим увеличением, рисунок позволяет различить внутреннюю полость

R, нм	a, нм	b, нм	c, нм	V, $\times 10^5$ нм^3
5	41 ± 12	55 ± 17	23 ± 9	$2{,}5 \pm 1{,}7$
10	37 ± 12	52 ± 17	23 ± 9	$2{,}1 \pm 1{,}5$

Таблица 4.1. Геометрические параметры глобул, образованных компактизованными в 80% изопропаноле молекулами ДНК Т4.

Расчеты проводились по разработанной методике учета эффекта *уширения* для двух значений радиуса кривизны иглы R: 5 и 10 нм; приведенные погрешности являются стандартными отклонениям средних арифметических, рассчитанных путем статистического анализа полученных АСМ-изображений глобул ($N = 55$). Обозначения таблицы: a, b и c — параметры эллипсоида, описывающего геометрию глобулы; a и b восстановлены по методике учета АСМ-уширения, c — половина высоты АСМ-изображения глобулы. V — объем эллипсоида, определенный по формуле: $V_{глобулы} = \frac{4}{3}\pi abc$. Для сравнения, объем молекулы ДНК Т4 $V_{ДНК} = \pi r^2 L$, ($r = 1$ нм, $L = 55 \times 10^3$ нм) составляет $1{,}7 \times 10^5$ нм^3

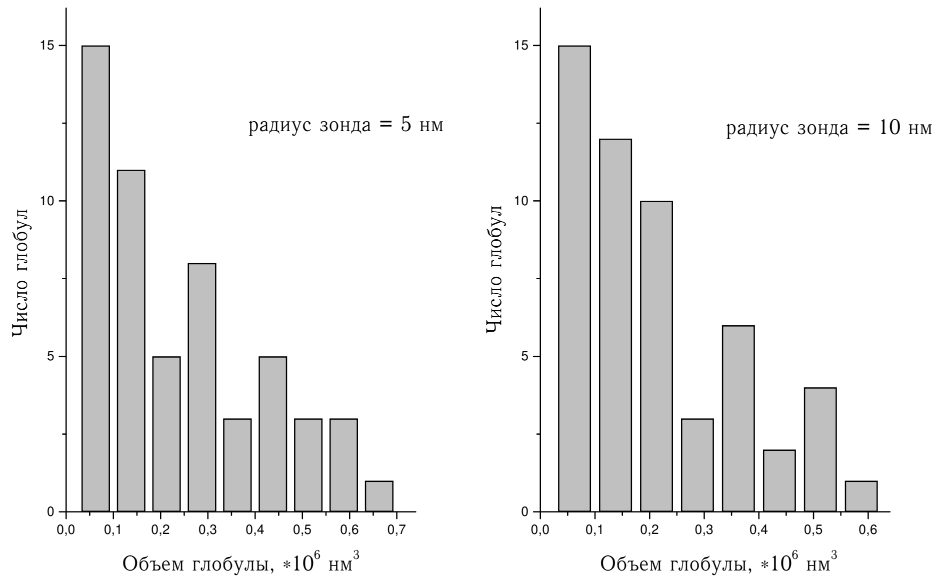


Рис. 4.11. Гистограммы распределения объема глобулярных частиц, образованных молекулами ДНК Т4 в 80% изопропаноле.

Значение объема было восстановлено для каждой глобулярной частицы с применением разработанной методики учета эффекта уширения для двух значений радиуса зонда: 5 и 10 нм

На рисунке 4.11 представлены гистограммы распределения значений объема глобулярных частиц. Наличие в набранной статистике глобул, характеризующихся малыми значениями объема (меньше, чем объем одной молекулы ДНК) объясняется, по-видимому, присутствием в используемом препарате *фрагментов* молекул ДНК. Из анализа рисунка 4.11 (ср. с таблицей 4.1) следует, что объем глобулы, образованной цельной молекулой ДНК (не фрагментом) составляет величину порядка 3–5 $\times$ 10^5 нм^3, что превышает величину объема молекулы ДНК Т4: 1,7 $\times$ 10^5 нм^3.

Т.о. образом можно предположить, что каждая глобула образована одной молекулой ДНК, находящейся в достаточно плотно упакованном состоянии.

Частично декомпактизованные структуры макромолекул ДНК Т4, получаемые при разбавлении 80% спиртового раствора в воде до 40–50%, исследовали следующим образом. В жидкостную ячейку, содержащую ДНК Т4 в виде глобул в 80% изопропаноле (20% воды), добавляли смесь изопропанола с водой (40% изопропанола + 60% воды), с целью понизить концентрацию спирта в ячейке.

Поскольку процесс компактизации ДНК в спирте обратим, то при понижении концентрации спирта в жидкостной ячейке[25)] глобулы претерпевают конформационные изменения, связанные с началом процесса декомпактизации. На рисунках 4.10 б и г изображены те же участки поверхности, что и на рисунках 4.10 а и в, но при понижении концентрации спирта в ячейке до значения 40–50%. Из рисунков видно, что в процессе декомпактизации изменились очертания глобулярных структур и их высота (ср. а и б).

Некоторые выводы о структуре компактизованной глобулы можно сделать, анализируя стадии динамического процесса декомпактизации, изображенные на рис. 4.10 в и г. Анализ рисунка показывает, что первоначально компактная глобула (рис. 4.10 в, отметка «Гл») в процессе декомпактизации уменьшается в высоте и позволяет визуализировать *центральную полость*, см. рис. 4.10 г и врезку.

Однако оказалось, что дальнейший процесс разворачивания глобул не происходит. Это можно объяснить наличием сил взаимодействия между молекулой и подложкой, которые и препятствуют разворачива-

---

[25)] улучшении качества растворителя

нию при уменьшении концентрации спирта. (Оказалось, что в условиях водно-спиртовой среды исследуемые объекты достаточно стабильны на подложке и не увлекаются зондом при сканировании).

Поэтому промежуточные состояния компактизации ДНК (между глобулой и клубком) получали следующим образом. Молекулы ДНК, находящиеся в 40% изопропаноле, вводили в жидкостную ячейку, а затем концентрацию спирта в ячейке повышали прокачиванием 80% изопропанола. При повышении концентрации спирта молекулы выпадали на поверхность подложки в *частично компактизованном состоянии*. Дальнейшая компактизация ДНК, адсорбированных на подложку, не наблюдалась, что, по-видимому, опять же объясняется взаимодействием молекул ДНК со слюдой.

АСМ-изображения частично компактизованных структур приведены на рис. 4.12. Было обнаружено, что начальным процессом компактизации глобул является закручивание отдельных участков макромолекулы ДНК в тороидальную структуру, эти компактные участки, по-видимому, и являются центрами дальнейшей компактизации.

На основании наблюдений можно предположить, что и компактные глобулы, визуализованные на рисунке 4.10 а и в являются продуктом именно тороидальной компактизации макромолекул ДНК и представляют собой плотные «клубки», в которых отдельные участки молекулы закручены вокруг тороидальных структур.

Следует отметить, что макромолекулы ДНК при повышении концентрации спирта в ячейке (от 40%) образуют не только тороидальные, но и (реже) стержнеобразные структуры, см. рисунок 4.13.

Стрежневые структуры, изображенные на рисунке 4.13, имеют ту же природу возникновения, что и приведенные на рисунке 4.8, где изображены результаты исследований, проводимых на воздухе. Видно, что при исследованиях в жидкости достижимо большее пространственное разрешение, что позволяет визуализировать отдельные нити молекулы ДНК, образующей исследуемую структуру. Из рисунка 4.13 б видно, что при сканировании под воздействием зонда микроскопа стержневая структура частично «расплелась».

Наблюдение в ряде случаев компактизованных структур, имеющих морфологию, отличную от тороидальной, может объясняться тем, что в эксперименте исследовались промежуточные стадии процесса компак-

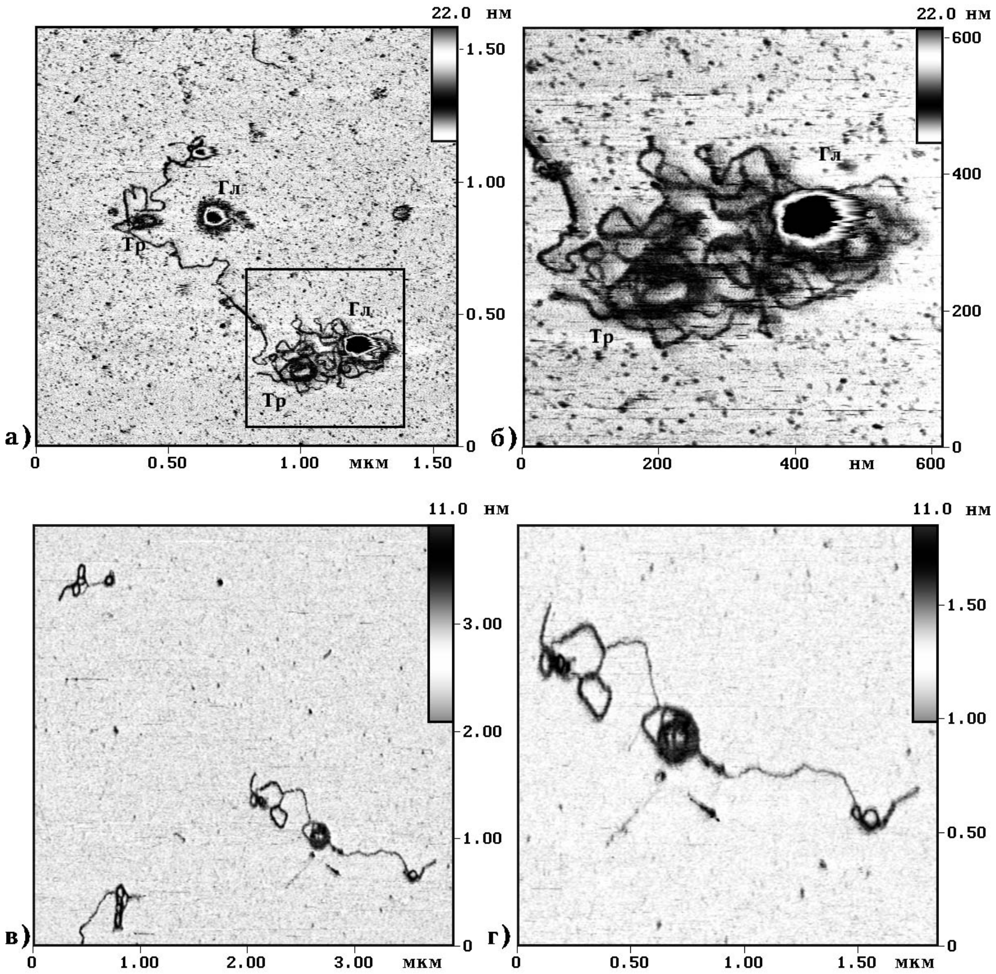


Рис. 4.12. Частично компактизованные молекулы ДНК.

а) и в) — молекулы, выпавшие на поверхность слюды из 40–50% водного раствора изопропанола;

б) и г) — те же участки поверхности с большим увеличением;

на рисунке отмечены тороидальные («Тр») и глобулярные структуры(«Гл»)

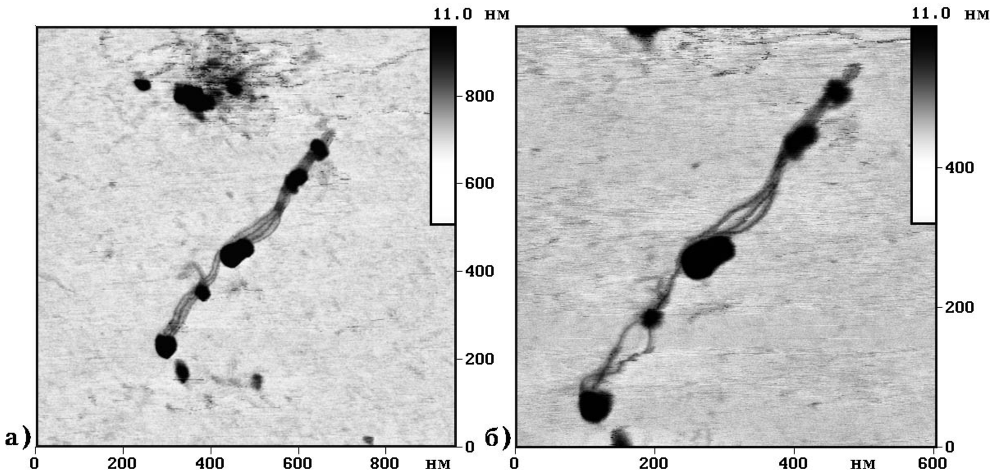


Рис. 4.13. Стержневая структура, образованная в результате компактизации ДНК в растворе изопропанола.

а), б) — Последовательно снятые АСМ-изображения одного участка поверхности с различным увеличением. Видно, что в процессе сканирования в результате воздействия зонда стержневая структура частично «расплелась»

тизации, в которых некоторое количество молекул может находиться в нестационарных морфологических состояниях

Т.о. мы исследовали различные стадии процесса компактизации молекул ДНК Т4 в водно-спиртовой среде при различных концентрациях. В зависимости от концентрации спирта были визуализованы как полностью компактные глобулы, так и частично компактизованные структуры. Применение методики восстановления реальной геометрии объектов исследования (учет эффекта АСМ-уширения) позволило рассчитать значение объема отдельной глобулы. С учетом полученного значения сделан вывод, что каждая глобула образована, по-видимому, одной молекулой ДНК, находящейся в плотноупакованном состоянии.

Частично компактизованные структуры включают участки начальной компактизации, где нить молекулы закручивается в тороподобные структуры. Можно предположить, что в процессе компактизации глобулы вокруг этих тороидальных центров закручивается все больше и больше витков молекулы, что приводит в результате к формированию структуры высокой плотности упаковки (возможно, в центре данной структуры существует полость, радиус которой совпадает с внутренним радиусом торов, служащих центрами компактизации).

4.2.3. Краткие выводы

Основные выводы, которые можно сделать на основе результатов, изложенных в данной главе, таковы.

- Исследованы компактные комплексы ДНК-ПАВ, визуализирована их тороидальная структура; с применением методики учета эффекта *уширения* определено количество входящих в комплекс молекул ДНК; продемонстрирована возможность СТМ-визуализации комплексов.

- Исследован процесс компактизации ДНК (1000–3000 п.о.) в водно-спиртовых средах. Показано, что результатом компактизации являются тороидальные и стрежневые структуры.

- Процесс компактизации ДНК Т4 (166 тыс. п.о.) исследован непосредственно в водно-спиртовой среде[26] с исключением процедуры высушивания образцов. Визуализированы компактные глобулы, имеющие формулу сплюснутого эллипсоида и состоящие из одной молекулы ДНК (что определено с применением методики учета эффекта *уширения*). При промежуточных концентрациях спирта визуализированы частично компактизованные образования, содержащие отдельные компактные участки, где витки молекулы закручены в тороидальные структуры.

Разработанные подходы проведения АСМ-эксперимента в *жидких средах* (т.е., потенциально, в условиях, близких нативным) могут быть полезны при исследованиях модельных систем транспорта генетического материала внутрь живых клеток. Подобные исследования могут также дать вклад в понимание механизмов процессов компактизации молекулы ДНК под воздействием различных компактизующих реагентов.

[26] в жидкостной ячейке АСМ

Глава 5

Применение метода АСМ для анализа структуры тонких органических пленок

[1] Ленгмюровская пленка [111] может быть определена как упорядоченный нерастворимый мономолекулярный слой, сформированный на границе фаз жидкость–газ. Пленкообразующее вещество должно быть амфифильным, т.е. состоять из компактной полярной головки (гидрофильной) и гидрофобного фрагмента (длинного алкильного радикала). Процесс формирования ленгмюровской пленки состоит в следующем. Вначале, при нанесении на поверхность раздела фаз пленкообразующего вещества в подходящем растворителе, площадь поверхности пленки сохраняется достаточно большой, чтобы после испарения растворителя с поверхности жидкости образовалась *двумерная газообразная* пленка. При сокращении площади, занимаемой пленкой, с помощью подвижного барьера происходит ориентация и упорядочивание молекул в пленке и она последовательно проходит различные двумерные фазовые состояния: от «*газообразного*» до «*твердого*»[20], что сопровождается изменением характера зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу $\pi = \pi(A)$; эти зависимости являются аналогом изотерм $p = p(V)$ для трехмерного случая [105]. Однако фазовые диаграммы двумерного случая носят более сложный характер, так, например, существуют двумерные фазовые состояния «жидко-растянутая»,

[1] Результаты, изложенные в данной главе, получены в ходе совместной работы с к.х.н. Г. К. Жавнерко (Институт физико-органической химии АН Беларуси, Минск)

«жидко-конденсированная пленка» [112] (которые различаются по характеру зависимости $\pi = \pi(A)$ на этих участках), не имеющие аналогов на изотермах $p = p(V)$ трехмерного случая.

Пленками Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ) называют совокупность ленгмюровских пленок на твердой поверхности [113]. Перенос пленки осуществляют обычно вертикальным способом (метод Ленгмюра-Блоджетт), пропуская подложку сквозь монослой, причем давление в пленке поддерживают постоянным путем сокращения площади пленки на водной поверхности подвижным барьером в процессе переноса монослоя. Структура сформированного покрытия определяется способом выделения (рис. 5.1).

Технология ЛБ позволяет достаточно просто изменять свойства поверхности и формировать качественные пленочные покрытия за счет точного контроля толщины пленки в процессе выделения (количества наносимых слоев), однородности покрытия, низкой шероховатости и высокой (при подборе адекватных условий) адгезии пленки к поверхности. Свойства пленок также можно легко варьировать, изменяя структуру полярной головки амфифильной молекулы, состав монослоя (двух- и многокомпоненные смеси молекул), а также варьируя условия выделения — состав субфазы и поверхностное давление. Это объясняет интерес к потенциальному использованию моно- и мультислойных пленок ЛБ в высокотехнологичных отраслях: микро- и наноэлектронике, оптоэлектронике, при разработке сенсоров и биосенсоров, био- и ультрафильтрационных мембран, создании нелинейнооптических материалов и оптических элементов (волноводы, люминесцентные устройства) с заданными свойствами, и т.д. Однако для широкомасштабного применения пленок данного типа необходимо прояснить основные механизмы, определяющие структурные и физические свойства сформированных тонкопленочных покрытий.

Влияние условий приготовления пленок на морфологию покрытий, сформированных на твердой поверхности

Морфология пленки на твердой поверхности зависит от совокупности факторов — условий формирования монослоя на межфазной поверхности, способа и условий переноса пленки на твердую поверхность, природы

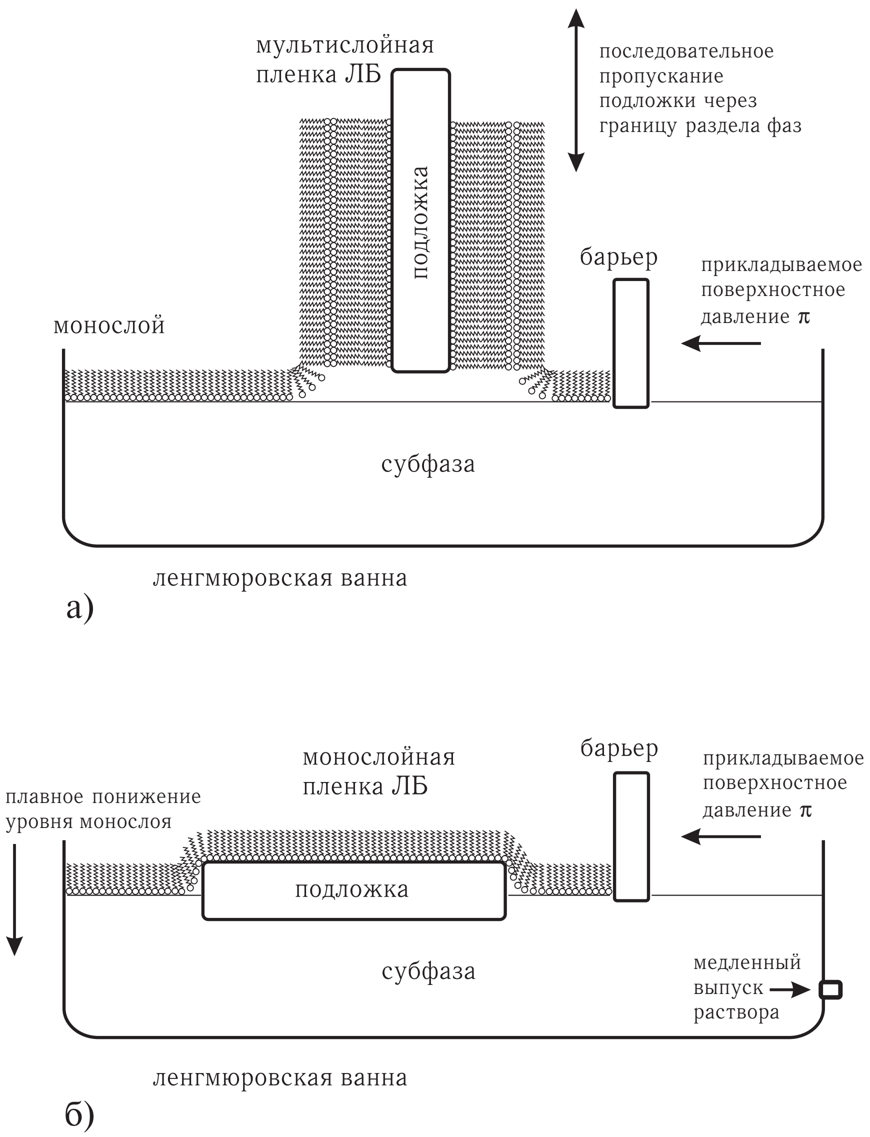


Рис. 5.1. Схема метода Ленгмюра-Блоджетт формирования тонких органических пленок на поверхности твердой подложки:

а) — вертикальный метод нанесения (в большей степени применим для создания мультислойных покрытий); б) — метод горизонтального осаждения (позволяет формировать качественные монослои) подложки и т.д. Весьма критичным для качественного переноса пленки является структура поверхностно-активного вещества и, в частности, природа полярной головки, которая в значительной мере определяет свойства монослоя. Действительно, многие амфифильные молекулы образуют стабильные монослои на водной поверхности, однако не все материалы могут быть успешно выделены в виде пленок ЛБ традиционным (вертикальным) методом выделения.

Выделение монослоев на твердую поверхность и формирование мультимолекулярных пленок вертикальным методом ЛБ происходит при циклическом погружении и подъеме подложки сквозь монослой, причем давление в пленке поддерживают постоянным в процессе переноса (рис. 5.1а). В этом случае формируется пленка (называемая пленкой Y-типа), состоящая из центросимметричных бислоев. В зависимости от строения, некоторые молекулы могут выделяться в виде монослоя только при погружении (X-тип выделения) или только при извлечении подложки из субфазы (Z-тип). При этом последовательно нанесенные монослои не обязательно обладают фиксированной ориентацией. Известно [20] (по данным рентгеноструктурного анализа), что многие пленки X-типа в результате переорганизации имеют внутреннюю ориентацию, совпадающую с пленками Y-типа (считается, что Y-пленки более стабильны). Чтобы избежать явлений, затрудняющих перенос монослоя обычным вертикальным методом выделения, таких как опрокидывание молекул в процессе переноса, кристаллизация вещества в мениске жидкости и т.д., мы и использовали метод горизонтального осаждения (ГО), см. рис. 5.1б. Это позволило, наряду с уже известными, наблюдать ряд малоизученных явлений или не описанных ранее в литературе.

Влияние природы субфазы на качество пленки

Существенное влияние на свойства монослоев оказывает состав субфазы и природа противоиона. Наиболее ярко это проявляется на примере поверхностно-активных кислот. Перенос на твердую подложку монослоев жирных высших кислот, сформированных на чистой водной поверхности, весьма проблематичен. При использовании подложки из слюды это связано с отрицательным зарядом, приобретаемым слюдой в водных растворах (карбоксильная группа также заряжается отрицательно), т.е.

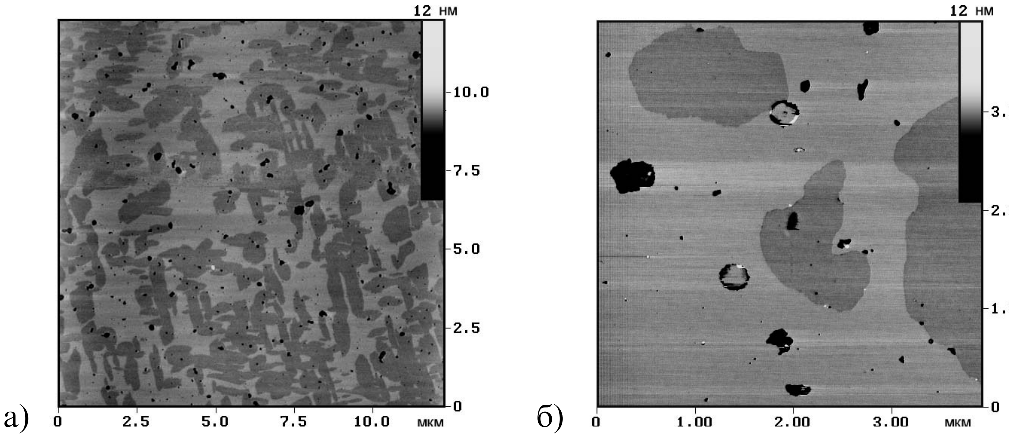


Рис. 5.2. Монослои бегеновой кислоты, приготовленные горизонтальным методом осаждения на слюду.

Монослои перенесены с поверхности чистой водной субфазы (а), и с поверхности CdTe-субфазы (см. ниже). АСМ-исследование позволяет визуализировать участки различного фазового состояния пленки, характеризующиеся различной высотой монослоя (разница 0,3–0,6 нм). Наряду с этим в пленке наблюдаются поры, глубиной до подложки (интенсивно темные области)

возникает та же проблема, что и при иммобилизации на поверхности подложки молекул нуклеиновых кислот. Поэтому, обычно, монослои жирных кислот переносят на подложку методом ЛБ в виде их солей с ионами различных металлов [114]. Однако методом горизонтального осаждения нам удавалось переносить качественную монослойную пленку бегеновой кислоты с водной поверхности на слюду, см. рис. 5.2а. На этом рисунке отчетливо видно сосуществование двух типов областей пленки, характеризующихся различной толщиной слоя, а, следовательно, и различной ориентацией углеводородных хвостов (различный угол с направлением нормали к поверхности). Мы полагаем, что наблюдаемые области являются участками различного двумерного фазового состояния пленки («твердая» и «жидко-конденсированная» фазы). Следует особо подчеркнуть, что при использовании традиционного вертикального метода ЛБ формирования покрытия увидеть подобные особенности организации монослоя на твердой поверхности (сосуществование фаз различной структуры) не удавалось. Не отмечены случаи их наблюдения и в литературе.

5.1. Влияние процессов внедрения CdTe-кластеров на структуру тонкопленочных покрытий бегеновой кислоты

Актуальной задачей наноэлектроники является создание гибридных органическо-неорганических наноструктур на твердой поверхности. Полупроводниковые кластеры представляют собой один из наиболее интересных и перспективных объектов исследования; их уникальные свойства обусловлены квантоворазмерными эффектами и проявляются, например, во взаимодействии с лазерным излучением: процессах рассеяния и поглощения, генерации второй гармоники и пр. Отличительной особенностью нанокомплексов на основе халькогенидов Cd, стабилизированных органическими лигандами, является наличие реакционноспособных так называемых E-центров[2)] (например, атомы Te в CdTe кластерах) на внешней поверхности нанокластеров. Особенности кластеров таковы, что большинство поверхностных атомов Cd связано с органическими лигандами, в то время как E-центры остаются несвязанными и влияют на процесс взаимодействия кластеров с электромагнитным излучением. Помимо этого, поскольку E-центры свободны, существует возможность их химической модификации и создания новых структур [115].

Нами была изучена возможность введения CdTe кластеров в монослой с последующим переносом наночастиц на поверхность на примере $Cd_{54}Te_{32}(SCH_2CH_2OH)_{X\approx 50}$. Исследованные нанокластеры имеют предположительно тетраэдрическое строение, причем тиоглицерол-стабилизирующие лиганды располагаются на углах и ребрах, оставляя открытыми для химического контакта атомы Te на плоских гранях тетраэдра [115]. С помощью методов кварцевого микровзвешивания, ИК- и УФ-спектроскопии было установлено[3)], что тиоглицерол-стабилизированные кластеры можно успешно внедрять в монослой бегеновой кислоты и переносить на твердую подложку с поверхности их водных растворов.

[2)] центров свечения

[3)] эти измерения проводили к. х. н. Г. К. Жавнерко (ИФОХ АН Беларуси, Минск) и к. х. н. А. Л. Рогач (ИФХИ БГУ, Минск)

5.1.1. Экспериментальная часть

[4] Образцы пленок были приготовлены вертикальным методом, см. рис. 5.1а, и методом горизонтального осаждения (рис. 5.1б), который, как было показано нами с помощью АСМ, в ряде случаев позволяет получать более качественные *монослойные* покрытия в сравнении с традиционным вертикальным способом[5]. Действительно, сформированный на водной поверхности монослой осаждается методом ГО «как есть» на предварительно погруженную под водную поверхность подложку в процессе медленного (около 0,01 мм в минуту) понижения уровня жидкости (в результате формируется структура Z-типа, рис. 5.1б). Пленки, полученные методом ЛБ при пропускании подложки сквозь монослой *вертикально* со скоростью 4 мм/мин, имели, как правило, структуру Y-типа.

Тиоглицерол-стабилизированные CdTe кластеры, использованные для внедрения в пленки, были приготовлены по методике, описанной в работе [115]. Монослой бегеновой кислоты формировали на поверхности водных растворов CdTe кластеров с концентрацией $0{,}1\text{–}1 \times 10^{-4}$ М. Монослой Z-типа или 1-Y бислой[6] бегеновой кислоты выделяли с водной поверхности или с субфазы, содержащей CdTe кластеры на поверхность подложки (слюды или пирографита), очищенную стандартным методом межслойного скалывания непосредственно перед нанесением монослоя.

АСМ исследования проводили на приборе Nanoscope-IIIa (Digital Instruments, США) с использованием кантилеверов из нитрида кремния жесткостью 0,32 Н/м с заостренными зондами в режиме контакта на воздухе. Было обнаружено, что использование данного контактного кантилевера[7] предпочтительнее в сопоставлении с другими того же типа, поставляемыми фирмой-производителем (жесткостью 0,06 Н/м, 0,12 Н/м

---

[4] Образцы пленок были приготовлены к. х. н. Г. К. Жавнерко, ИФОХ АН Беларуси, Минск

[5] вертикальный метод в большей степени применим для формирования мультислойных ЛБ покрытий

[6] При использовании в качестве подложки слюды было обнаружено (методом АСМ), что при следовании процедуре нанесения 1-Y бислоя (вертикальным методом) реально на подложку удается перенести только *монослой* (по-видимому, перенос пленки имеет место только при извлечении подложки из субфазы через монослой).

[7] см. таблицу А.1, стр. 227

или 0,58 Н/м), при исследованиях тонких пленок, поскольку разрушающее воздействие зонда на образец в этом случае минимально. Это может быть связано с тем, что данный кантилевер обладает наименьшей массой, и, как следствие, наименее инерционен. Силу воздействия при сканировании варьировали в широком диапазоне: от единиц до десятков и сотен наноньютонов, при этом в ряде случаев возможность проведения *неразрушающих исследований* требовала минимизации силы воздействия зонда. Частоту строчной развертки выбирали в диапазоне 5–60 Гц; при получении молекулярного разрешения для минимизации теплового дрейфа использовали максимальное значение[8)] (60 Гц).

5.1.2. Результаты и их обсуждение

Спонтанное формирование кристаллических включений в мономолекулярных пленках бегеновой кислоты, осаждаемых с CdTe-субфазы

Мы обнаружили, что осажденная с CdTe субфазы на поверхность подложки (метод ГО) мономолекулярная пленка бегеновой кислоты Z-типа содержит спонтанно сформированные кристаллические образования, имеющие ламелярную структуру. Близкую морфологию имела пленка, сформированная по процедуре получения 1-Y бислоя (метод ЛБ). Анализ сечения АСМ-изображений этих образований показывает, что их высота над поверхностью слюды близка утроенной длине молекулы бегеновой кислоты в максимально вытянутой конформации (около 3 нм), см. рис 5.3. В случае использования пирографитовой подложки и следования процедуре формирования 1-Y бислоя (метод ЛБ) структура покрытия, фактически, идентична: также наблюдаются включения аналогичных кристаллических структур, см. рис. 5.4, но морфология покрытия, окружающего кристаллиты, менее однородна. Согласно результатам АСМ-исследования высота монослоя над поверхностью подложки (слюды) варьируется в диапазоне 2,2–2,7 нм (занижение высот обусловлено контактными деформациями, см. раздел 2.1). Высота кристаллитов над поверхностью монослоя (для слюды) лежит в интервале 4,2–6,2 нм. Высота кристаллитов над поверхностью пирографитовой подложки приблизительно равна 8 нм (т.е. соотносится со значениями для

[8)] определяется скоростью оцифровки данных в схеме конкретного прибора подложки-слюды). Поскольку, как показали контрольные эксперименты, подобные кристаллиты *не формируются* при нанесении *аналогичного* монослоя с поверхности воды или $CdCl_2$ субфазы, мы полагаем, что частичная кристаллизация бегеновой пленки при нанесении с поверхности CdTe субфазы обусловлена влиянием именно *кластеров*, которые могут являться центрами начальной кристаллизации.

Предположение о том, что CdTe кластеры находятся именно *внутри* кристаллитов, подтверждается тем фактом, что спектроскопические методы исследования детектируют присутствие кластеров в приготовленном покрытии; причем их детектируемое количество для конкретного образца напрямую коррелирует с величиной поверхностной концентрации кристаллических структур, визуализованных АСМ.

Однако, *непосредственно доказать* методом АСМ присутствие кластеров в сформированном покрытии *не удалось*. Тем не менее, представлялось интересным исследовать структуру и особенности спонтанно образованных кристаллитов. Было установлено, что ориентация ламелей кристаллических структур подчиняется определенным закономерностям. Так, углы между ламелями кратны 60°, как при использовании подложки из слюды, так и графита (рис. 5.5).

Гистограммы показывают, что среднее значение величины угла между ламелями составляет 60±7°, как в случае подложки из слюды (рис. 5.5а), так и пирографита (рис. 5.5б). Возможную погрешность измерения, связанную с наличием теплового дрейфа, мы оценивали путем контрольного измерения углов между кристаллографическими осями подложки (угол 60°). Было показано, что в условиях данного эксперимента анализируемая погрешность составляет величину меньшую, чем 3°.

Для установления ориентации ламелей относительно кристаллографических осей подложки использовали следующую процедуру. Определяли ориентацию ламелей. Затем в монослойном покрытии формировали искусственный дефект путем воздействия на эту область зонда микроскопа с увеличенной силой (до 100 нН и более) при медленной скорости сканирования (частота строчной развертки менее 3 Гц). В результате материал пленки удаляли зондом микроскопа в пределах выбранного окна сканирования. В этом окне получали АСМ-изображение атомной ре-

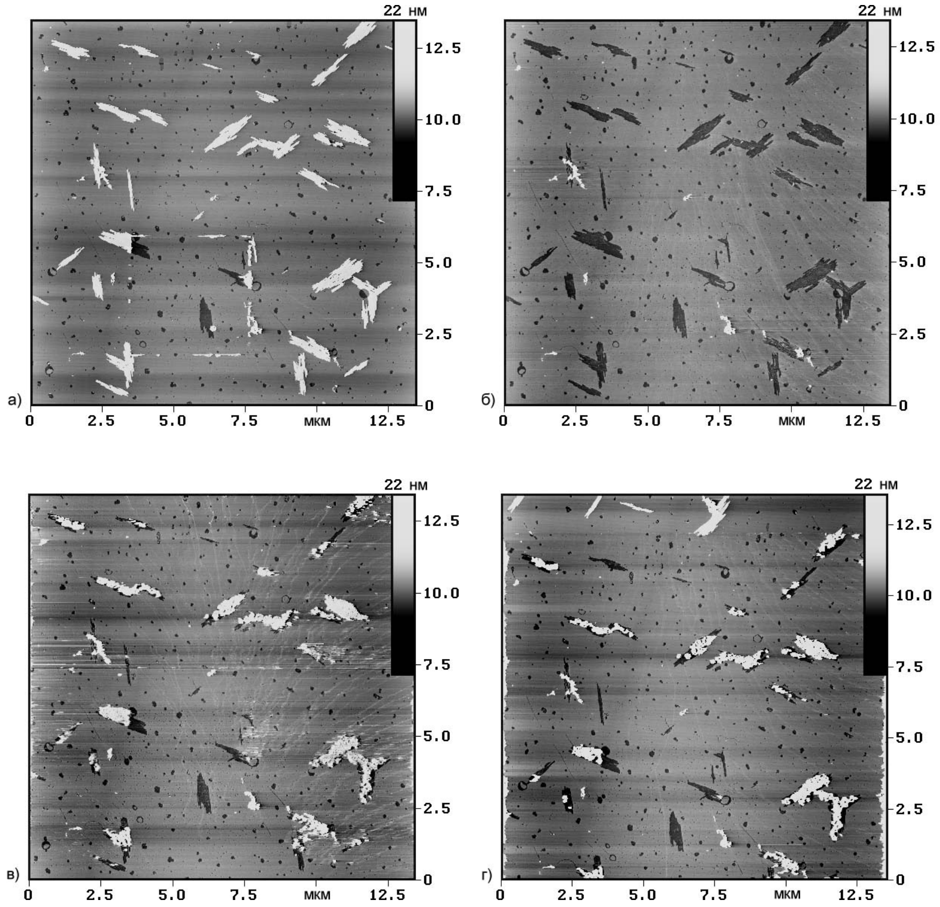


Рис. 5.3. Кристаллиты в монослое бегеновой кислоты, осажденной на подложку слюды методом ГО с поверхности субфазы, содержащей CdTe кластеры (динамика разрушения/восстановления).

Изображения получены последовательно: а) АСМ-изображения исходных структур, записанные при минимальном воздействии зонда; б) частичное разрушение кристаллитов при увеличении силы воздействия зонда (более 100 нН); в) и г) последующее восстановление исходных кристаллических структур при минимизации силы воздействия зонда

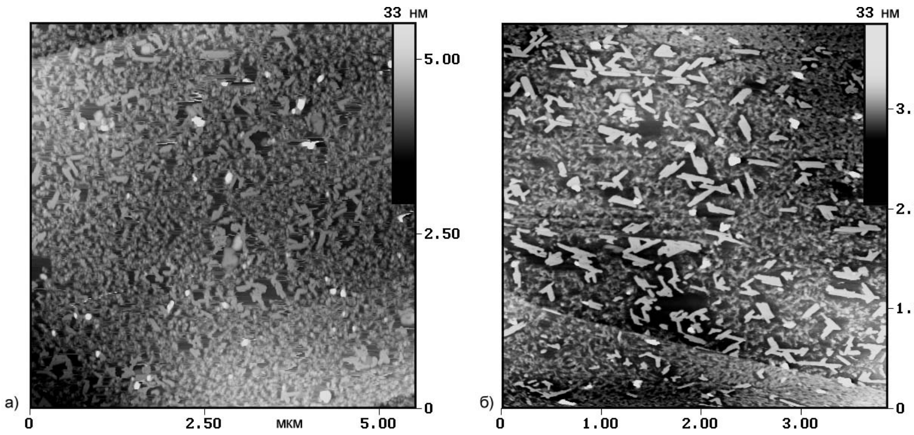
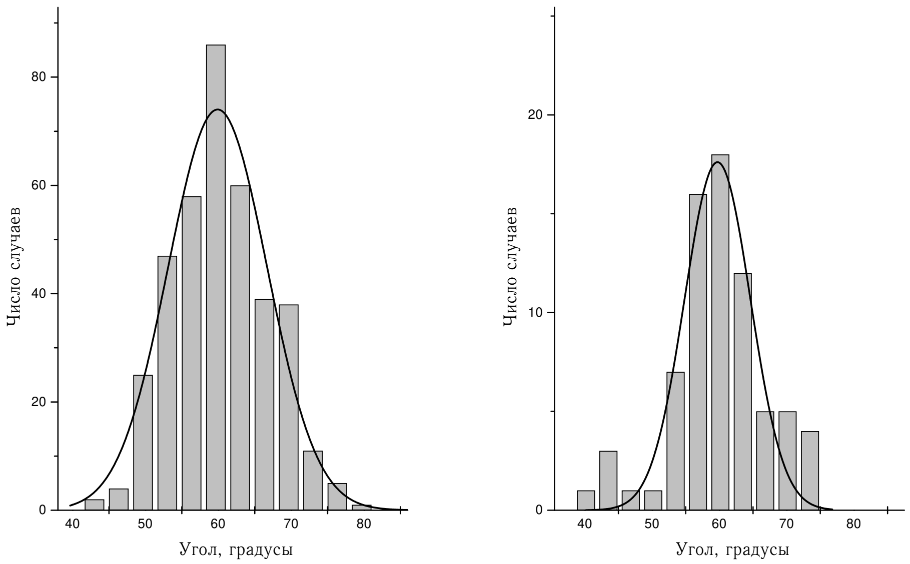


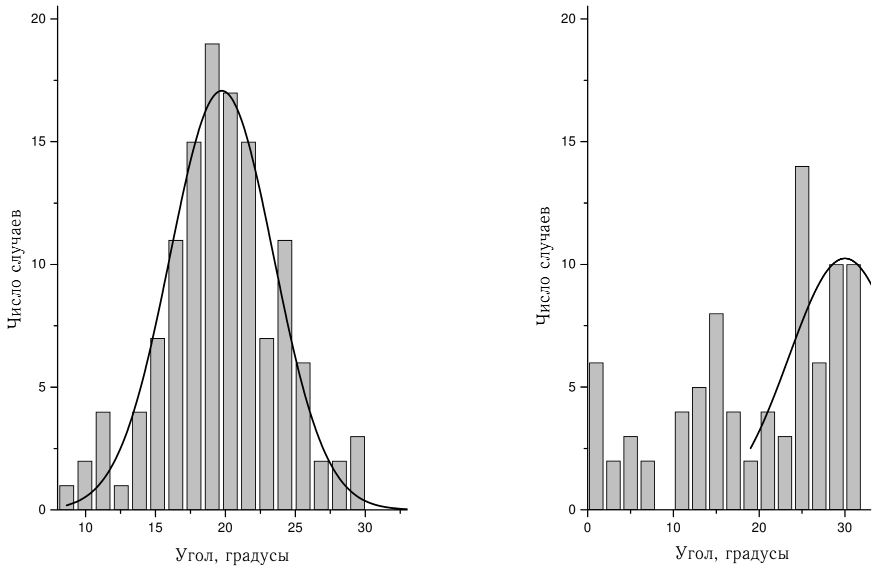
Рис. 5.4. Кристаллиты, сформировавшиеся в пленке бегеновой кислоты, перенесенной на подложку пирографита вертикальным методом ЛБ с поверхности субфазы, содержащей CdTe кластеры



а) б)

Рис. 5.5. Распределение угла взаимоориентации между парами кристаллических ламелей.

Ламели спонтанно формировались в пленке бегеновой кислоты, нанесенной с поверхности субфазы, содержащей CdTe кластеры, на подложку: а) — слюды, методом ГО б) — пирографита, методом ЛБ



а) б)

Рис. 5.6. Распределение угла между ламелями в пленке бегеновой кислоты и осями решетки подложки.

Ламели спонтанно сформировались в пленке бегеновой кислоты, нанесенной с поверхности субфазы, содержащей CdTe кластеры, на подложку: а) — слюды, методом ГО б) — пирографита, методом ЛБ

шетки подложки и определяли направление основных поверхностных кристаллографических осей.

Как показали эксперименты по АСМ-визуализации молекулярной структуры поверхности кристаллитов (см. ниже раздел 5.3) вектор $\vec{a}$ поверхностной решетки (ЦП-тип) сонаправлен с ориентацией ламели. Оказалось, что для подложки из слюды направление конкретной ламели кристаллической структуры образует с одной из основных осей решетки[9)] ([10], [01] или [11]) угол близкий 20°. На рис. 5.6 а представлена гистограмма распределения значений угла между направлением ламели кристаллической структуры и одной из кристаллографических осей слюды (ближайшей, к направлению ламели).

При построении гистограммы использовали абсолютное значение измеренного угла (поэтому гистограмма ограничена интервалом $0 \div 30^\circ$). При этом в набранной статистике число положительных и отрицатель-

[9)] гексагональная решетка

ных значений данной величины примерно совпадало. Из гистограммы следует, что среднее значение угла между кристаллографической осью поверхностной решетки слюды и направлением ориентации ламелей кристаллической структуры составляет $20 \pm 4^\circ$. Это позволяет предположить, что ламели предпочтительно ориентированы вдоль направлений $[2\bar{1}]$, [32], [13] или [31], [23], $[\bar{1}2]$ решетки слюды. Действительно, углы между направлениями [31] и [10], [23] и [11], $[\bar{1}2]$ и [01] имеют величину $19{,}1^\circ$, а углы между $[2\bar{1}]$ и [10], [32] и [11], [13] и [01] составляют ту же величину, но со знаком минус.

Те же измерения проводили для пленок, сформированных на подложке из пирографита. Измерение угла между направлениями кристаллических ламелей и кристаллографическими осями графита дает значение $30 \pm 7^\circ$[10]), гистограмма распределения результатов измерения приведена на рисунке 5.6б. Полученное значение позволяет предположить, что предпочтительным направлением ориентации ламелей в этом случае является направление [12] поверхностной решетки графита.

Отметим, что распределение значений измеряемых углов менее локализовано при использовании в качестве подложки пирографита, в сравнении с подложкой из слюды (ср. рис. 5.6б и а). У нас нет однозначного объяснения наблюдаемому различию, особенно учитывая тот факт, что распределения углов между кристаллическими ламелями, приведенные на рис. 5.5а и б, демонстрируют фактически идентичные зависимости и для случая слюды, и для случая пирографита.

Динамика процессов разрушения/восстановления кристаллических структур, включенных в мономолекулярные пленки бегеновой кислоты

Несмотря на локальную устойчивость кристаллических образований к силовому воздействию зонда на небольшой участок поверхности, именно они (а не монослой) в первую очередь разрушаются в случае, когда величина воздействующей силы увеличена (до 100 нН), а размер кадра составляет значительную величину (до 15×15 мкм^2). После нескольких сканирований с увеличенной силой воздействия зонда на АСМ-изображении наблюдается следующая картина: участки пленки, соответствовавшие монослойным участкам, характеризуются лишь увели-

[10]) здесь, как и в предыдущем случае для слюды, приведено стандартное отклонение

ченным количеством пор и мелких дефектов, в то время как кристаллические образования «исчезают». Анализ высот АСМ-изображения показывает, что в тех местах, где прежде были кристаллические структуры, остается лишь чистая поверхность слюды. Визуально это наблюдается в виде дефектов (дыр) в монослое, контуры которых в точности повторяют контуры кристаллических структур, присутствовавших на этих местах прежде, см. рис. 5.3б.

Данный эффект может свидетельствовать о склонности кристаллических структур взаимодействовать с иглой микроскопа. Причем, при последующих сканированиях с большим размером кадра и минимизованной силой, на краях области сканирования наблюдалось лишь незначительное количество удаленного материала, что позволяет сделать вывод о его адсорбции *на зонде*[11)].

Если после разрушения кристаллических структур увеличенной силой продолжать сканирование, уменьшив силу воздействия зонда, то через несколько последовательных сканирований материал вновь появится в тех участках, где прежде были кристаллические структуры, см. рис. 5.3 (в и г). При этом восстанавливается и *высота* кристаллических образований, что свидетельствует об их значительной устойчивости. Сходный эффект переноса материала пленки с подложки на зонд и обратно был описан в работе [64].

Т.о. нам удалось визуализировать динамический и *обратимый* процесс разрушения кристаллических структур, что позволяет сделать ряд заключений.

- Взаимодействие зонда и образца не ограничивается лишь действием сил притяжения и отталкивания между ними. В случае, когда при сканировании имеет место динамический процесс разрушения образца, вызванный превышением интенсивности силового взаимодействия зонд-образец некоторого критического значения, зонд может являться *резервуаром* для материала, удаленного с образца в процессе сканирования.

[11)] Действительно, площадь боковых граней зонда составляет несколько микрон (см. таблицу А.1 на стр. 227), поэтому значительное количество удаленного материала пленки может при сканировании некоторое время «облеплять» боковые стенки зонда, несущественно влияя на качество получаемых АСМ-изображений.

- При уменьшении интенсивности взаимодействия материал с зонда может перейти *обратно* на образец. Этот эффект способен приводить к ошибкам в интерпретации, если для работы используется «грязный» (т.е. использованный прежде) левер, на боковых стенках которого присутствует адсорбированный материал. В этом случае, при сканировании могут наблюдаться структуры, не связанные с особенностями данного образца, а динамически сформированные при переходе материала с левера на исследуемую подложку.

Мы наблюдали сходный эффект при исследовании нуклеиновых кислот, когда предварительное сканирование[12)] образца, характеризующегося высокой поверхностной концентрацией изучаемых структур, приводило к тому, что последующее сканирование[13)] поверхности, заведомо *свободной* от каких-либо адсорбированных объектов, позволяло, в ряде случаев, визуализировать те же самые биообъекты[14)] (отличаемые в силу их специфической геометрии). Эффект проявлялся тем более выражено, чем выше сродство просканированных первоначально биообъектов к поверхности, просканированной после. В силу этого можно констатировать, что для постановки *адекватных* контрольных экспериментов необходимо либо использовать для каждой серии образцов новые (или очищенные) зонды, либо, по крайней мере, ставить контрольные эксперименты *до* опыта: иначе существует вероятность обнаружить в контроле те же структуры, что и в опыте, и допустить ошибку в интерпретации.

Особенности структуры пленки бегеновой кислоты на поверхности пирографитовой подложки

При исследовании пленки бегеновой кислоты на пирографите[15)] мы наблюдали, что материал пленки организовывался в упорядоченные протяженные структуры (см. рис. 5.7), похожие на «грядки». Ориентация и организация грядок подчиняется определенным закономерностям: углы между ними кратны 60°, а расстояние между грядками составляет величину $6{,}3 \pm 0{,}4$ нм. Угол между направлениями грядок и основными кристаллографическими осями поверхностной решетки пирографита состав-

[12)] с увеличенной силой воздействия зонда
[13)] тем же зондом
[14)] единичные
[15)] приготовленной по способу формирования 1-Y бислоя

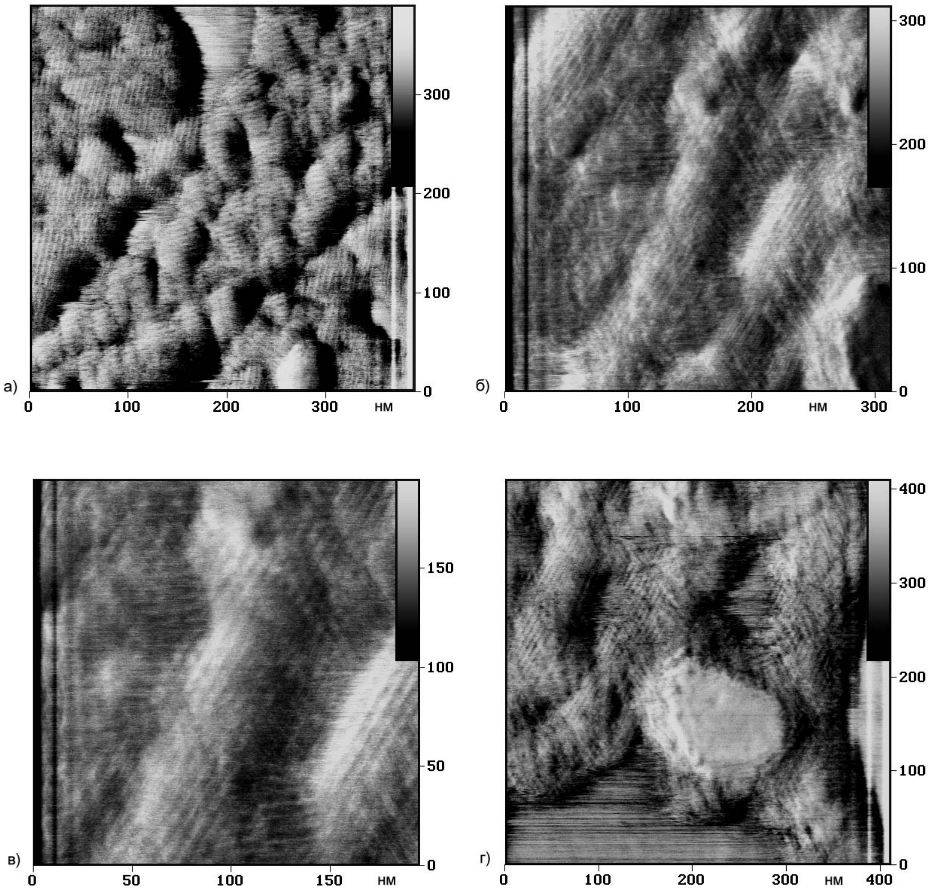


Рис. 5.7. Структура пленки ЛБ бегеновой кислоты, нанесенной на пирографит; Грядки ориентированы под углом 30° к основным осям подложки, расстояние между «грядками» составляет 6,3 нм

ляет 30° (рис. 5.8), т.о. грядки ориентированы вдоль того же направления подложки пирографита, что и описанные выше *кристаллические* ламели.

Было обнаружено, что сформированное покрытие на графите характеризуется нестабильностью и разрушается иглой при сканировании при незначительном увеличении воздействующей силы (или увеличении характерного времени воздействия τ при уменьшении размеров кадра). При исследовании динамики разрушения покрытия был обнаружен эффект временного формирования сходных[16)] упорядоченных структур («грядок»), характеризующихся той же фиксированной взаимоориентацией (угол между этими структурами также близок 60°) и тем же фиксированным расстоянием между грядками (около 6,3 нм). Было обнаружено, что ориентация описываемых структур также составляет угол

[16)] с самоорганизованными

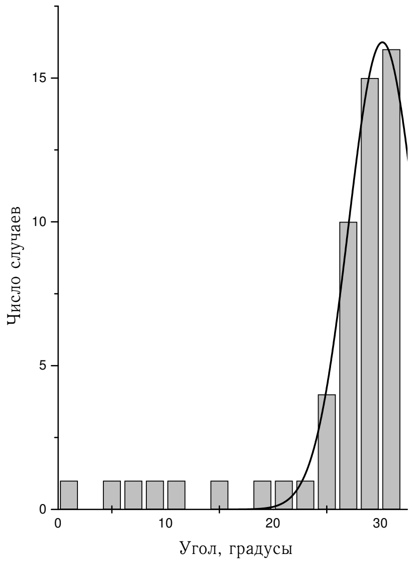


Рис. 5.8. Распределение угла между направлением «грядок» в пленке бегеновой кислоты и основными осями поверхностной решетки пирографитовой подложки.

Измерения проводили для «грядок», изображенных на рис. 5.7; сходная зависимость получена для структур, визуализированных на рис. 5.9

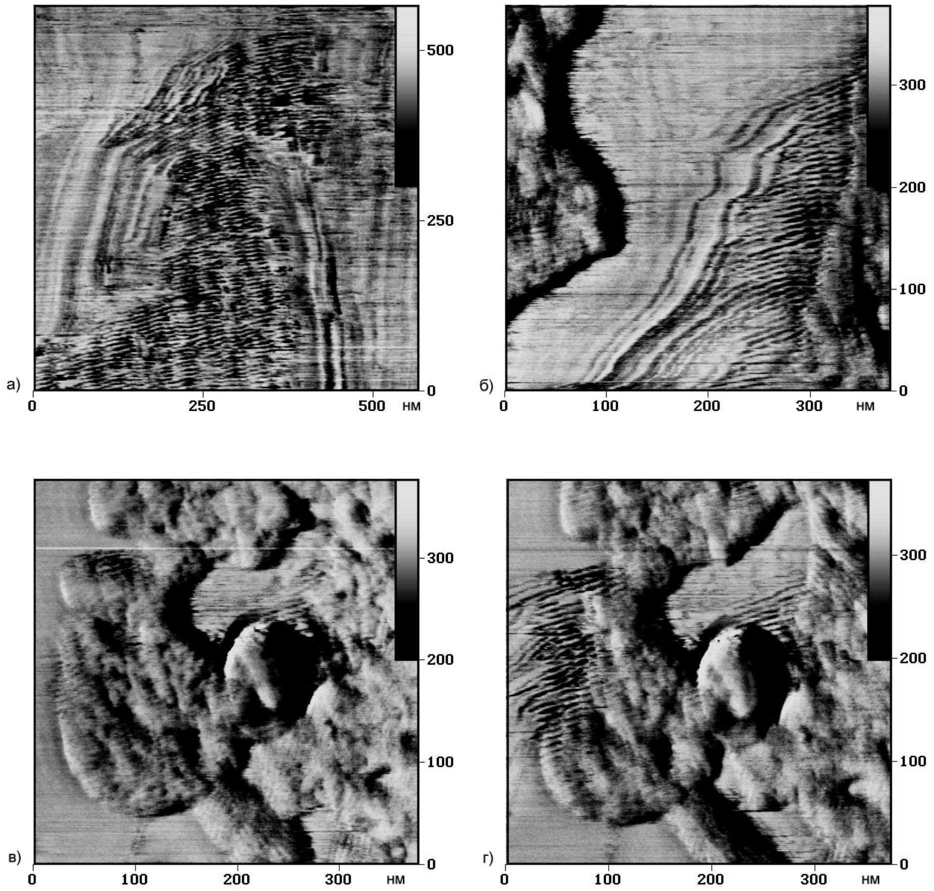


Рис. 5.9. Временные структуры, формирующиеся в процессе динамического разрушения при сканировании пленки бегеновой кислоты на пирографите.

Ориентация этих структур относительно осей подложки и их периодичность идентичны структурам, изображенным на рис. 5.7

близкий 30° с направлениями кристаллографических осей графита, что свидетельствует о выделенности данного направления для эффекта взаимодействия молекул бегеновой кислоты с пирографитовой подложкой. Следовательно, можно сделать вывод, что в обоих случаях формирование грядок обусловлено одним механизмом.

Мы считаем, что наблюдаемые структуры являются *полуцилиндрическими мицеллами*, формируемыми на поверхности гидрофобной пирографитовой подложки молекулами бегеновой кислоты. Действительно, представляется, что наблюдаемые структуры не могут являться т.н. «волнистой» (ripple) фазой, которая обнаруживается при исследовании бислойных тонких пленок. Авторы работы [116] исследовали «волнистую» структуру, которая спонтанно формировалась в бислоях фосфолипидов, сформированных на поверхности слюды. Однако период обнаруженных структур составлял значительную величину — 27 нм и 53 нм. Кроме того, ориентация «волн» не подчинялась, по-видимому, каким-либо закономерностям, как это имело место в нашем случае.

Авторы работ [117, 118] обнаружили сходные[17)] протяженные образования, сформированные молекулами ПАВ на поверхностях слюды и пирографита. Так в работе [118] исследовали процесс самоорганизации[18)] молекул катионного ПАВ: тетрадецилтриметиламмоний бромида (C_{14}TAB), которые, как показали авторы, формировали на поверхности подложки цилиндрические (в случае подложки из слюды) и полуцилиндрические (при использовании пирографита) образования. В случае полуцилиндров они были образованы молекулами ПАВ, стабилизированными гидрофобным взаимодействием с подложкой и друг с другом (поэтому полярные группы молекул формировали *внешнюю* поверхность полуцилиндра). При этом направления ориентации «грядок» на поверхности пирографита, как и в нашем случае, составляла угол в 30° с направлением основных кристаллографических осей подложки (как пишут авторы, исследуемые образования «... ориентированы перпендикулярно оси симметрии подложки», что эквивалентно нашим наблюдениям). Этот эффект может объясняться тем, что в случае такой ориентации полуцилиндрических мицелл отдельные молекулы ПАВ, лежащие на подложке, ориентированы вдоль кристаллографических направлений графита, причем периодичность решетки графита вдоль этих направлений (0,246 нм) и период углеводородной цепи молекулы (0,254 нм) имеют близкие значения.

Период упаковки полуцилиндрических мицелл, обнаруженный авторами рассматриваемой работы, составил $4{,}7 \pm 0{,}3$ нм. Длина углеводородных цепей молекул бегеновой кислоты (C_{22}), объекта исследования в нашем случае, в 1,5 раза больше, чем молекул C_{14}TAB, исследованных в [118]. Поэтому наблюдаемый нами период «грядок», формируемых молекулами бегеновой кислоты ($6{,}3 \pm 0{,}4$ нм) вполне соотносится со значением, полученным в упомянутой работе. Эти закономерности по-

[17)] с наблюдаемыми нами

[18)] из раствора ПАВ, концентрация которого в два раза превышала концентрацию мицеллообразования зволяют нам сделать вывод, что особенности самоорганизации молекул бегеновой кислоты на поверхности пирографита объясняются именно формированием полуцилиндрических мицелл.

Краткие выводы

- Пленки бегеновой кислоты позволяют извлекать из субфазы неорганические частицы — CdTe кластеры, которые, возможно, являются центрами начальной кристаллизации материала пленки. Эта кристаллизация приводит к формированию включенных в пленку ламелярных кристаллических образований. (Обнаружено, что их молекулярная упаковка может быть описана центрированной прямоугольной ячейкой, и измерены параметры ячейки см. ниже — раздел 5.3).

- Обнаруженные кристаллические образования характеризуются устойчивой морфологией. Это подтверждается тем, что, после динамического разрушения кристаллических структур при увеличении силового воздействия зонда на образец, они восстанавливают свою структуру при уменьшении соответствующего силового воздействия (т.е. наблюдается динамический перенос материала образца на зонд и обратно с сохранением морфологии кристаллических образований).

- Важную роль в организации материала пленки играет ее взаимодействие с подложкой. Этот вывод следует из установленных закономерностей взаимоориентации кристаллических ламелярных структур, включенных в пленки и углов относительной ориентации кристаллографических осей пленки и подложки (для случаев пирографитовой и слюдяной подложки). Показано, что углы взаимоориентации кристаллических ламелей приблизительно равны 60°, как при использовании в качестве подложки слюды, так и пирографита, в то время как измерение углов ориентации кристаллитов пленки относительно основных направлений поверхностной решетки подложки дает значение, близкое 20° для слюдяной подложки и 30° для пирографита.

- Установлено, что материал пленки бегеновой кислоты на поверхности пирографита организуется в упорядоченную «грядкообразную» структуру, с фиксированным направлением грядок для различных доменов (угол между доменами 60°, угол с направлением кристаллографических осей графита 30°) и фиксированным расстоянием между грядками (6,3 нм), близким удвоенной длине молекул бегеновой кислоты (2,8 нм). Показано, что образование сходных структур сопровождает процесс динамического разрушения пленки под воздействием зонда микроскопа, при этом наблюдаются те же характерные значение углов взаимоориентации и углов с кристаллографическими осями подложки, а также те же значения расстояний между грядками. Сделано предположение, что наблюдаемые структуры являются полуцилиндрическими мицеллами, образованными молекулами бегеновой кислоты и стабилизированными гидрофобным взаимодействием.

5.2. Исследование тонких пленок белков

[19] Иммобилизация белковых молекул на твердой поверхности достаточно актуальна как для практических задач (создание био- и имунносенсоров, например), так и для фундаментальных исследований строения белка [20]. При решении этих задач существует проблема стабилизации белков на поверхности подложки [29]. Ввиду большого разнообразия белковых молекул, чрезвычайно сложно найти универсальную методику их жесткой фиксации на подложке. Основные белки можно рассматривать как амфифильные макромолекулы [119], поскольку они имеют гидрофильные и гидрофобные зоны. Следовательно, можно использовать все достоинства технологии ЛБ для создания однородных монослойных пленок белков на водной поверхности и переноса их на твердую подложку. На примере ряда белков (гемоглобин лошади, бычий сывороточный альбумин (БСА) и др.) мы исследовали возможность формирования на

[19] Результаты, изложенные в данном разделе, носят, во многом, предварительный характер, и приведены для демонстрации двух аспектов: 1) возможности формирования искусственных дефектов в тонкопленочных покрытиях, 2) возможности качественного определения упругих свойств сформированных покрытий.

различных поверхностях как индивидуальных, так и композиционных пленок.

Экспериментальная часть

[20] Монослои белковых молекул на водной поверхности формировали, используя различные варианты доставки вещества на поверхность. Во-первых, использовали тот факт, что исследуемые белки самопроизвольно концентрируются на водной поверхности после введения их растворов в водную субфазу (pH 5,8). В этом случае сжимали монослой спустя примерно через 30 минут после нанесения вещества на поверхность. Во-вторых, белок непосредственно на водную поверхность наносили из спиртового раствора, который готовили, растворяя 1–2 капли водного раствора белка, содержащего необходимую навеску, в 0,5 мл этилового спирта. В третьих, на водную поверхность наносили раствор белка, приготовленный в смеси хлороформ: ацетон: спирт в объемном соотношении 1:1:1 (ХАС раствор).

Особое внимание уделили гемоглобину. Гемоглобин, как основной компонент эритроцитов крови, осуществляющий доставку кислорода от легких к тканям, достаточно доступен. При растворении гемоглобина в ХАС растворе спустя 2–3 часа белок выделял гем (окрашенный в розовый цвет раствор), а в осадок выпадал белок белого цвета. Оказалось, что осадок опять возможно перевести в водный раствор (pH 5,1–5,3), как и при растворении исходного гемоглобина. Как белок, выпавший в осадок (глобин), так и геминовая часть обладали поверхностно-активными свойствами, что позволило формировать ЛБ покрытия как из белков без геминовой группы, так и, наоборот, только из геминовых групп.

Пленки (монослои) были перенесены на поверхности подложек (слюда, кремний, пирографит) с поверхности водной субфазы методом ГО при давлении выделения π в диапазоне $20 \div 25$ мН/м.

АСМ-измерения проводили на приборе «Nanoscope-IIIa» в режимах контакта и модуляции силы (см. раздел 1.3.2, стр. 30) с использованием стандартных кантилеверов (таблица А.1) жесткостью 0,32 Н/м.

[20] Образцы пленок были приготовлены к. х. н. Г. К. Жавнерко, ИФОХ АН Беларуси, Минск

Обсуждение результатов

Сопоставление морфологии поверхности пленки гемоглобина, ковалентно сшитой (с помощью глутарового альдегида) с гидрофильной поверхностью, обработанной аминопропилтриэтоксисиланом, и монослойной пленки гемоглобина, осажденной с водной поверхности методом ГО на подложку, показывает преимущества второго способа формирования пленки. Если в первом случае имела место хаотичная агрегация белка из раствора на поверхности (изображение не приведено), то в случае осаждения монослоя белка с водной субфазы образуется однородное монослойное покрытие (рис. 5.10). Однородную пленку молекул гемоглобина удается сформировать на водной поверхности и перенести на поверхность подложки при различном способе доставки вещества на водную субфазу: как из спиртового раствора (рис. 5.10а), б)), так и из ХАС раствора (рис. 5.10в), г)).

Оказалось возможным сформировать пленки из разных фрагментов гемоглобина. Так, и на поверхность графита (рис. 5.10з), и)), и на поверхность слюды (рис. 5.10к)) методом ГО переносится качественная пленка из нанесенного на водную поверхность окрашенного (геминовой группой) ХАС раствора (после удаления из этого раствора выпавшего белого осадка белка). Вещество, оставшееся в ХАС растворе, во-первых, оказалось поверхностно-активным, что позволило сформировать пленку на водной поверхности, во-вторых, эта пленка, перенесенная на подложку, оказалась значительно более устойчива на поверхности графита по сравнению с поверхностью слюды. Отметим также, что после расщепления гемоглобина белковая часть молекулы также остается поверхностно-активной, поскольку и из нее можно формировать твердую пленку на водной поверхности и успешно переносить ее на гидрофильный кремний (рис. 5.10л)) или слюду (рис. 5.10м)).

Гемоглобин растворяется в достаточно узком интервале pH, поэтому можно было предположить, что его переход на водную поверхность из объема обусловлен изменением растворимости при изменении pH. В то же время бычий сывороточный альбумин растворим в достаточно широком интервале pH. Тем не менее, также удалось сформировать твердую пленку БСА на водной поверхности при доставке белка на субфазу из водного раствора: пленка успешно была перенесена на твердую подложку (рис. 5.10ж)). Аналогичная однородная монослойная пленка формируется и при использовании процедуры доставки на водную поверхность альбумина из спиртового раствора (рис. 5.10д), е)).

Искусственные дефекты в белковых пленках. Высокое качество пленки может вызвать неоднозначность в интерпретации результата АСМ-исследования, поскольку отсутствие каких-либо характерных дефектов (пор и т.п.) не позволяет оценить толщину пленки, и вообще сделать вывод о *присутствии* пленки на подложке. Действительно, однородная поверхность может наблюдаться и в том случае, если пленку не удалось успешно перенести с границы раздела фаз на твердую подложку (для ряда материалов достаточно сложно определить адекватные условия переноса: состав субфазы, поверхностное давление и пр.).

Полученные белковые пленки характеризовались высокой однородностью поверхности, поэтому мы проводили их дополнительный анализ, путем воздействия сканирующего зонда на некоторый выбранный участок при увеличенной величине силы (до 100 нН) и медленной скорости сканирования (частота строчной развертки около 1 Гц). Данная процедура, в случае наличия на подложке органической пленки, позволяла формировать в ней искусственный дефект квадратной формы, в котором материал пленки был удален зондом при сканировании. При указанных условиях эта процедура не приводит еще к разрушению подложки и позволяет проводить как контроль наличия пленки на поверхности, так и измерение ее толщины (следует, однако, учитывать занижение результатов АСМ-измерения этого параметра в силу контактных деформаций, см. раздел 2.1). Типичные АСМ-изображения подобных искусственно сформированных дефектов в белковых пленках изображены на рис. 5.10.

Пары изображений а) и б), в) и г), д) и е), з) и и) рис. 5.10 получены в режиме модуляции силы (см. раздел 1.3.2, стр. 30), первое изображение пары является обычным топографическим, а второе отображает величину амплитуды колебаний левера, находящегося в контакте с поверхностью и испытывающего со стороны пьезоманипулятора периодическое воздействие. Согласно изложенному в разделе 1.3.2, более светлые участки этого амплитудного изображения соответствуют менее жестким участкам исследуемой поверхности; результаты наблюдений подтверждают правильность нашей интерпретации формирования контраста изобра-

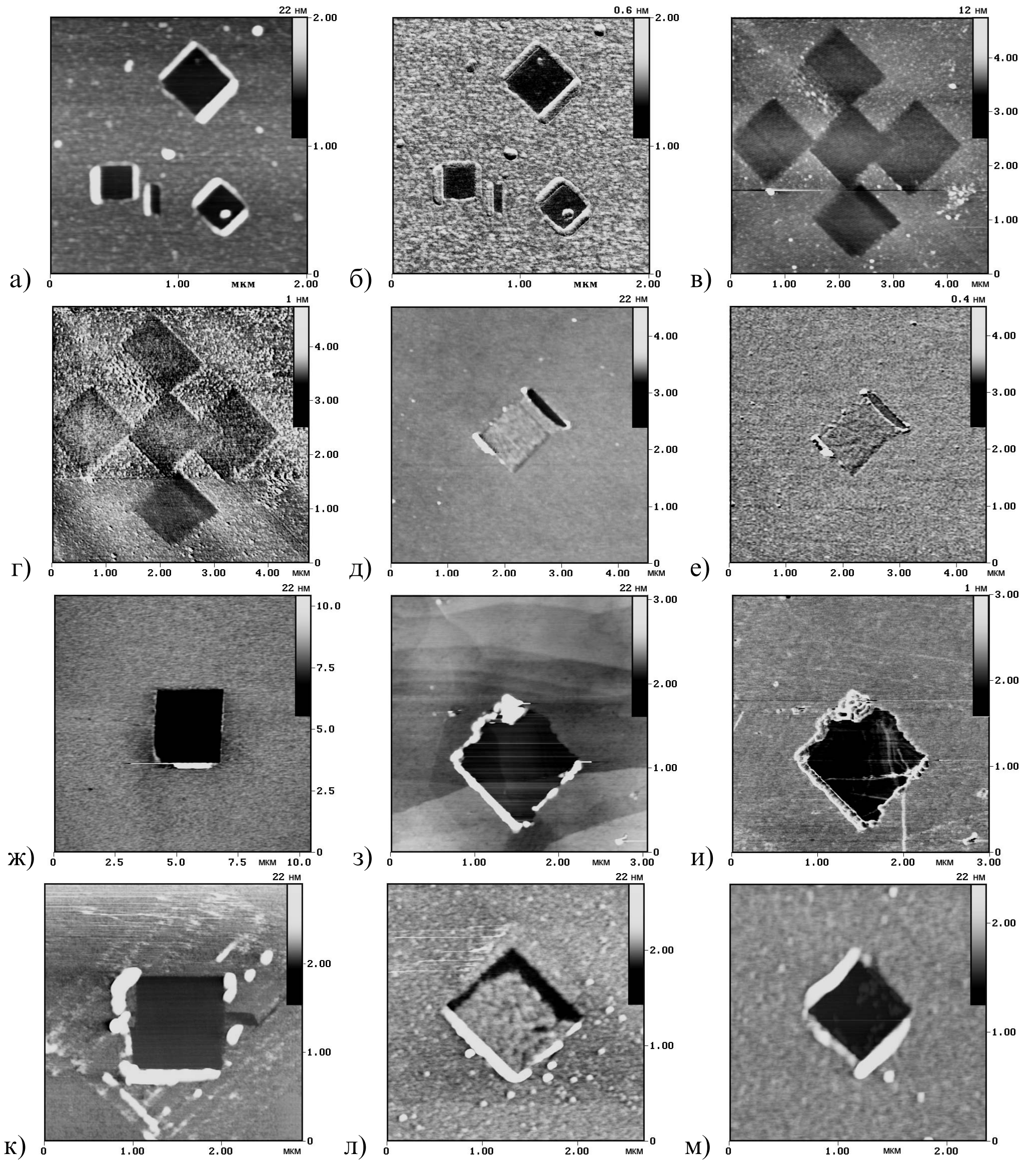


Рис. 5.10. Искусственные дефекты в белковых пленках, сформированные предварительным сканированием с увеличенной силой воздействия зонда:

а)–г) монослой гемоглобина на слюде (метод ГО при $\pi = 25$ мН/м); д)–ж) монослой альбумина на кремнии (д, е)) и слюде (ж)) (метод ГО при $\pi = 25$ мН/м); з)–к) монослой геминовой части гемоглобина на графите (з, и)) и слюде (к)) (метод ГО при $\pi = 20$ мН/м); л), м) монослой гемоглобина без геминовой части на кремнии (л)) и слюде (м)) (метод ГО при $\pi = 20$ мН/м). Пленки перенесены с водной субфазы при различных способах доставки на поверхность жидкости (см. текст).

Более светлые участки изображений б), г), е), и), полученные по методу модуляции силы (см. раздел 1.3.2) соответствуют менее жестким участкам исследуемой поверхности (ср. а) и б), в) и г), д) и е), з) и и)) жений АСМ модуляции силы. Белковые пленки были выбраны в качестве объекта этих измерений именно в силу того, что они достоверно характеризуется меньшим значением модуля упругости в сравнении с подложкой.

Метод формирования искусственных дефектов в тонких пленках может найти универсальное применение. Мы продемонстрировали этот подход на примере белковых пленок, однако мы также успешно использовали его и для анализа других покрытий. Формирование искусственных дефектов позволяло не только детектировать присутствие пленки в случае ее высокого качества, но и определять толщину покрытия, а также, например, при исследовании молекулярной упаковки, анализировать взаимоориентацию решеток пленки и подложки. Более того, путем определения предельного силового воздействия зонда, необходимого для того, чтобы искусственный дефект был сформирован, можно проводить сравнительный анализ механической прочности тонкопленочных покрытий.

5.3. Исследование влияния условий формирования покрытий и природы подложки на молекулярную упаковку тонких органических пленок

Основным преимуществом метода сканирующей зондовой микроскопии при исследовании молекулярной структуры тонких пленок является возможность определения параметров элементарной ячейки для локально-неупорядоченных, островковых и доменных пленок. Действительно, в настоящее время для исследования структуры поверхности широко используются дифракционные методы: дифракция электронов, рентгеновских лучей, нейтронов, ионов и нейтральных атомов [120, 121]. Эти методы позволяют определять структуру поверхности с высокой степенью точности лишь при условии, что исследуемая поверхность характеризуется определенной степенью упорядоченности во *всей* области взаимодействия с зондирующим пучком. Наличие в пленке разориентированных доменов, островков, кристаллических включений и пр. осложняет дифракционную картину и создает сложности при интерпретации результатов и определении искомых параметров.

В этой связи метод атомно-силовой микроскопии представляется весьма перспективным для исследования структуры молекулярной упаковки тонких органических пленок, в том числе в сравнении и с микроскопическими методами. Действительно метод АСМ характеризуется невысокой интенсивностью воздействия на образец (в отличие от электронной и ионной микроскопии), позволяет проводить исследования диэлектрических структур (в отличие от СТМ) и характеризуется высоким пространственным разрешением, поскольку позволяет определять параметры молекулярной или атомной упаковки поверхности.

Остановимся на основных результатах, полученных рядом авторов при исследованиях молекулярной упаковки тонких органических пленок.

Краткий обзор литературы, посвященной исследованиям молекулярной упаковки органических пленок

Влияние принципа плотной упаковки углеводородных цепей на параметры ячейки н-парафинов было рассмотрено Китайгородским [122, 123] на основе геометрического анализа. (Нормальные парафины (C_nH_{2n+2}) являются простейшими полимерами, и выяснение их строения имеет большое значение для понимания общих закономерностей органической кристаллохимии). Исходным положением служило рассмотрение плотного контакта молекул плоской зигзагообразной формы, оси которых параллельны. Данный анализ позволил определить возможные упаковки молекул в н-парафинах, см. таблицу 5.1. Известные кристаллические структуры н-парафинов относятся к небольшому числу предсказанных в результате рассматриваемого анализа. Как оказалось, принцип плотной упаковки углеводородных цепей может определять и молекулярную упаковку амфифильных молекул, имеющих полярную группу и длинный углеводородный фрагмент (молекул жирных кислот и т.п.).

В работе [124] авторы проводили сравнительный анализ применения методов АСМ и дифракции электронов к исследованию молекулярной упаковки твердых растворов н-парафинов и многокомпонентных восков. Методом атомно-силовой микроскопии (результаты находились в

Слой	Параметры ячейки слоя, нм	φ_a	φ_b	φ_{c*}
H $[0, 0]$	$a = 0{,}48$, $\gamma = 120°$	$90°$	$90°$	$0°$
R $[0, 0]$	$a = 0{,}742,\ b = 0{,}496,\ \gamma = 90°$	$90°$	$90°$	$0°$
R $[0, \pm 2]$	$a = 0{,}900,\ b = 0{,}496,\ \gamma = 90°$	$90°$	$55°, 124°$	$34°$
R $[\pm 1, 0]$	$a = 0{,}742,\ b = 0{,}557,\ \gamma = 90°$	$63°, 117°$	$90°$	$27°$
R $[0, \pm 1]$	$a = 0{,}785,\ b = 0{,}496,\ \gamma = 90°$	$90°$	$71°, 109°$	$19°$
R $[\pm 1, \pm 1]$	$a = 0{,}785,\ b = 0{,}557,\ \gamma = 81°$	$63°, 117°$	$71°, 109°$	$31°$
R $[\mp 1, \pm 1]$	$a = 0{,}785,\ b = 0{,}557,\ \gamma = 98°$	$63°, 117°$	$71°, 109°$	$31°$
M $[0, 0]$	$a = 0{,}42,\ b = 0{,}44,\ \gamma = 111°$	$90°$	$90°$	$0°$
M $[\pm 1, 0]$	$a = 0{,}49,\ b = 0{,}44,\ \gamma = 107°$	$59°, 121°$	$90°$	$32°$
M $[0, \pm 1]$	$a = 0{,}42,\ b = 0{,}51,\ \gamma = 107°$	$90°$	$60°, 120°$	$32°$
T $[\pm 1/2, 0]$	$a = 0{,}43,\ b = 0{,}45,\ \gamma = 103°$	$73°, 107°$	$90°$	$18°$
T $[\pm 1/2, 1]$	$a = 0{,}43,\ b = 0{,}52,\ \gamma = 109°$	$73°, 107°$	$120°, 60°$	$36°$

Таблица 5.1. Возможные упаковки молекул в н-парафинах, из работы [123].

Двумерная ячейка слоя определяется подъячейкой (H — гексагональная, R — ромбическая, M — моноклинная, T — триклинная) и числами [m, n] определяющих вертикальный сдвиг молекул, связанных трансляциями на величину идеальных параметров подъячеек (a_0, b_0), при заполнении слоя. В таблице приведены параметры упаковки слоев: a, b и γ — параметры двумерной ячейки; φ_a, φ_b и φ_{c*} — углы наклона оси молекулы к осям a, b и нормали к плоскости ab соответственно согласии с данными дифракции электронов) были определены параметры элементарной ячейки (прямоугольная) как для поверхности кристалла чистого н-$C_{36}H_{74}$ ($a = 0{,}47(5)$ нм, $b = 0{,}78(5)$ нм), так и поверхностей твердых растворов: н-$C_{35}H_{72}$/ н-$C_{36}H_{74}$ ($a = 0{,}46(6)$ нм, $b = 0{,}76(1)$ нм) и $C_{32}H_{66}$/ н-$C_{36}H_{74}$ ($a = 0{,}59(6)$ нм, $b = 0{,}78(5)$ нм). Возможность наблюдения с помощью АСМ двумерной упорядоченной структуры в последнем случае достаточно неожиданна, поскольку строение молекул компонентов твердого раствора различается на четыре метиленовых группы. Можно предположить, что визуализация молекулярной упаковки была возможна на участках локальной однородности пленок.

Работа [125] посвящена АСМ-исследованию пленок транс-6-октадеценовой кислоты, перенесенных по методике ЛБ (25 или 5 слоев) на поверхность стекла с субфазы двух типов: $CdCl_2$ или $TbCl_3$ (концентрацией 10^{-4} М). Авторы обнаружили, что тип упаковки пленки существенно зависит от природы противоина. Так, пленки, перенесенные на подложку с субфазы, содержащей ионы Tb^{3+}, обнаруживали в фурье-спектре несколько кратных рефлексов, причем их значения позволяют предположить, что упаковка пленки характеризуется переорганизованной в сверхструктуру центрированной прямоугольной (ЦП) решеткой с параметрами $a = 0{,}46 \pm 0{,}02$ нм и $b = 0{,}89 \pm 0{,}03$ нм. Площадь, приходящаяся на молекулу, в этом случае составляет $0{,}205 \pm 0{,}010$ нм^2, что хорошо согласуется со значением предельной молекулярной площади $0{,}210 \pm 0{,}004$ нм^2, которое было определено авторами по изотерме сжатия пленки на поверхности субфазы. В то же время пленки, перенесенные с $CdCl_2$ субфазы характеризовались косоугольной решеткой с параметрами: $a_1 = 0{,}48 \pm 0{,}03$ нм, $a_2 = 0{,}51 \pm 0{,}03$ нм и $\gamma = 68 \pm 3°$, что соответствует площади на молекулу $0{,}23 \pm 0{,}02$ нм^2.

Авторы работы [126] исследовали методом АСМ молекулярную упаковку гидрофобной поверхности верхнего слоя 3-, 5- и 7-слойного покрытия арахидата кадмия (CdA_2). Авторы определили параметры ячейки для данной поверхности (тип: прямоугольная с двумя молекулами в базисе[21)]), которые составили: $a = 0{,}48 \pm 0{,}03$ нм, $b = 0{,}74 \pm 0{,}04$ нм. Авторы отмечают, что в ряде измерений параметры ячейки были искажены и связывают это с влиянием зонда микроскопа. Однако представляется, что локальные деформации или локальные смещения молекул

[21)] тип решетки был известен из результатов рентгеновского рассеяния под воздействием зонда в процессе сканирования *не могут* сказаться на результатах определения параметров элементарной ячейки при измерениях АСМ, поскольку воздействие зонда не может приводить к «переупаковке» молекул на всем сканируемом участке. По всей видимости, наблюдаемые искажения могут быть объяснены влиянием температурного дрейфа. Стоит отметить, что обнаруженные авторами параметры решетки близки параметрам плотной упаковки слоев углеводородных цепей R$[0,0]$, см. таблицу 5.1.

Сосуществование трех различных типов молекулярных упаковок в трехслойных ЛБ пленках арахидата бария (BaA_2) было обнаружено авторами работы [127]. Это демонстрирует высокую чувствительность организации пленок к структуре противоиона (который определяет площадь полярной группы на поверхности субфазы): замена иона Cd^{2+} ионом Ba^{2+} существенно изменяет параметры молекулярной упаковки. Три обнаруженных типа упаковки для исследуемых пленок характеризовались близкими значениями площади, приходящейся на молекулу. При этом каждый тип упаковки различался ориентацией молекул относительно направления, нормального к поверхности подложки (что определялось по различающейся высоте соответствующих участков АСМ-изображения пленки над поверхностью подложки).

Параметры первого из обнаруженных типов элементарной ячейки (триклинная ячейка, $a_1 = 0{,}42 \pm 0{,}01$ нм, $a_2 = 0{,}45 \pm 0{,}01$ нм, $\gamma = 76 \pm 1^\circ$) позволили авторам сделать вывод, что в этом случае структура пленки определяется принципом плотной упаковки углеводородных цепей с образованием слоев, характеризующихся «T»-подъячейкой (см. таблицу 5.1). Второй тип упаковки идентифицировался авторами как структура с «R»-подъячейкой (R$[0,\pm 1]$, см. таблицу 5.1), также обусловленной принципом плотной упаковки углеводородных цепей (ЦП ячейка, $a = 0{,}51 \pm 0{,}01$ нм, $b = 0{,}79 \pm 0{,}01$ нм). Третья обнаруженная структура упаковки была менее упорядочена в сравнении с первыми двумя, что не позволило определить параметры ячейки. Угол наклона молекул[22)] составлял 26° и 19° соответственно для первых двух типов, третий тип упаковки был образован, по-видимому, вертикально ориентированными молекулами. Весьма интересно, что все типы упаковки характеризовались близкими значениями площади, приходящейся на молекулу,

[22)] измерялся по толщине слоев

причем при исследованиях конкретных пленок в различных участках их поверхности было возможно обнаружить все три типа упаковки (авторы определили, что первый тип упаковки занимает 70% поверхности пленки, второй и третий — 5 и 25% соответственно).

Как показано в работе [128], весьма специфическое влияние на структуру пленки арахидатов оказывает использование в качестве противоиона Ca^{2+}. Авторы исследовали трехслойную ЛБ пленку арахидата кальция (CaA_2) и обнаружили, что структура молекулярной упаковки пленки не обладает зеркальной симметрией. Пленка имеет доменную структуру с двумя типами решетки, которые являются зеркальным отражением друг друга. Элементарная ячейка включает восемь молекул, с углом наклона их к подложке в 26°, параметры ячейки: $a_1 = 1{,}86 \pm 0{,}01$ нм, $a_2 = 0{,}894 \pm 0{,}006$ нм, $\gamma = 71{,}3 \pm 0{,}5^\circ$). Авторы связывают наблюдаемую специфику структуры пленки с конкуренцией требования плотной упаковки углеводородных цепей и значением площади полярной группы, определяемым радиусом ее экранировки противоионом кальция.

Обобщающее рассмотрение влияния природы противоина, присутствующего в субфазе, на структуру пленок солей жирных кислот приводится в работе [129]. Авторы указывают на корреляцию между значениями площади, приходящейся на молекулу слоя, и электроотрицательностью противоина, см. таблицу 5.2. По мере уменьшения электроотрицательности противоина возрастает степень ионности связи и, как оказалось, возрастает площадь, приходящаяся на молекулу в пленке. Так, Cd, Mn и Pb образуют ковалентную связь, а щелочноземельные (Ba, Ca и Mg) взаимодействуют с ионами жирных кислот электростатически. Очевидно, именно тип связи определяет площадь, приходящуюся на отдельную полярную группу.

При этом требование плотной упаковки углеводородных частей молекул также влияет на структуру пленок. Если площадь, приходящаяся на полярные группы молекул больше, чем площадь поперечного сечения плотноупакованных углеводородных цепей (около $0{,}18$ нм^2), то удовлетворить требованию плотной упаковки «хвостов» можно лишь допустив возможность наклона осей молекул к подложке. Как показали авторы, значение угла наклона (и параметров ячейки), как правило, не произвольно, но подчиняется закономерностям, предсказанным Китайгородским [122] для структуры упаковки н-парафинов (см. таблицу 5.1).

Противо-ион	тип элементарной ячейки	наклон молекул	молекулярная площадь, $нм^2$	электроотрицательность
Pb	ЦП	0°	0,179	1,8
Cd	ЦП	0°	0,18	1,7
Mg	ЦП	0°	0,187	1,3
Mg	триклинная	0°	0,187	1,3
Mn	ЦП	19°	0,195	1,5
Ca	триклинная	26°	0,196	1,0
Ba	ЦП	19°	0,202	0,9
Ba	триклинная	26°	0,204	0,9
Zn	гексагональная	33°	0,222	1,6

Таблица 5.2. Влияние природы противоиона на параметры элементарной ячейки молекулярной упаковки тонких пленок солей жирных кислот (3–7 слоев); из работы [129]

В то же время, как отмечают авторы рассматриваемой работы, неожиданными были результаты исследования молекулярной упаковки пленки (7 слоев) арахидата цинка. Они обнаружили, что структура пленки описывается гексагональной решеткой с параметром 0,47–0,48 нм. Высокая симметрия упаковки пленки соответствует, т.н. «газокристаллическому» состоянию (характеризующемуся невысокой плотностью упаковки), когда молекулы сохраняют некоторую ротационную свободу (это обеспечивает аксиальную симметрию области, занимаемой каждой молекулой) [123].

В работе рассматривается также эффект влияния свойств подложки на структуру молекулярной упаковки сформированных на ее поверхности пленок слой жирных кислот. Это влияние может проявляться весьма различным образом для разных противоинов. Отметим, в частности, факт уменьшения молекулярной площади в пленках стеарата свинца (с 0,21 до 0,18 $нм^2$), сформированных на поверхности слюды, при увеличении числа слоев в пленке (1-3-5-7). Молекулярная упаковка верхнего слоя 7-слойного покрытия релаксирует, по-видимому, к невозмущенному влиянием подложки состоянию, поскольку те же параметры упаковки характеризуют 200-слойное покрытие (по данным рентгеноструктурного анализа). При использовании в качестве подложки поверхности кремния (покрытой оксидом и существенно более инертной, чем слюда) молекулярная упаковка верхнего слоя уже трехслойного покрытия характеризуется теми же невозмущенными параметрами.

Авторы работы рассматривают также механизмы формирования сверхструктур в молекулярной упаковке поверхности, связывая их возникновение с присутствием регулярных дефектов упаковки, обусловленных необходимостью удовлетворения требованиям плотной упаковки углеводородных частей и полярных групп молекул.

Сходное обобщение АСМ-результатов исследования упаковки молекул жирных кислот в зависимости от условий формирования пленок (влияние субфазы и природы подложки) проводится в обзоре [130]. Подчеркивается, что параметры элементарной ячейки, симметрия и площадь на молекулу не зависят от длины алкильной цепи жирных кислот (C_{16}–C_{22}), а контролируются особенностями взаимодействия противоиона с карбоксильной группой (COOH). Отмечен факт [130] невозможности достигнуть молекулярного разрешения на *монослойных* пленках солей жирных кислот (за исключением стеарата свинца), в отличие от мультислойных покрытий.

Комплексное исследование пленок жирных кислот, перенесенных на поверхности слюды, пирографита или кремния, осуществили авторы работы [131]. Применение метода АСМ позволило авторам определить параметры элементарной ячейки для кадмиевых солей стеариновой, арахиновой, бегеновой и лигноцериновой кислот, см. табл. 5.3. Как отмечают авторы, молекулярное разрешение могло быть достигнуто лишь в случае, когда толщина покрытия превышала три монослоя (даже для пленок, осажденных горизонтальным методом). Значения параметров элементарной ячейки, приведенные в двух нижних строках табл. 5.3, могут быть обусловлены принципом плотной упаковки углеводородных цепей: ср. со значениями параметров $a = 0{,}496$ нм и $b = 0{,}785$ нм упаковки слоев углеводородных цепей $\mathrm{R}[0, \pm 1]$ таблицы 5.1.

Авторы работы [132] сообщают о том, что ими впервые методом АСМ была визуализована молекулярная упаковка монослойных пленок жирных кислот (лигноцериновой и стеариновой), перенесенных на слюду с водной поверхности[23)]. В схеме эксперимента использовалось последовательное многоступенчатое сжатие монослоя на поверхности раздела фаз, что, по-видимому, и позволило перенести качественный

[23)] без каких-либо противоионов в субфазе

	a, нм	b, нм
стеарат (С18)	0,45–0,47	0,74–0,76
арахидат (С20)	0,46–0,48	0,73–0,76
бегенат (С22)	0,47–0,49	0,73–0,78
лигноцеринат (С24)	0,46–0,49	0,79–0,80

Таблица 5.3. Параметры элементарной ячейки молекулярной упаковки тонких пленок солей кадмия жирных кислот (из работы [131]).

Пленки формировались с субфазы, содержащей катионы Cd^{2+}; ЦП-тип решетки

монослой на поверхность подложки по традиционной вертикальной методике ЛБ. Авторы определяют молекулярную упаковку поверхностей монослоев как гексагональную с параметром ячейки $a = 0{,}43$ нм для лигноцериновой и $a = 0{,}42$ нм для стеариновой кислот. Однако эти значения соответствуют 0,15 и 0,16 нм^2 площади, приходящейся на молекулу в слое, что, по-видимому, маловероятно, поскольку минимальное значение данного параметра для кристаллов рассматриваемых жирных кислот составляет около 0,18 нм^2, см. [122]. Наблюдаемое расхождение объясняется, по-видимому, ошибкой в калибровке пьезоманипулятора, допущенной авторами: при калибровке использовалось значение 0,46 нм для параметра ячейки слюды, в то время как этот параметр составляет 0,52 нм. Если воспользоваться данным значением и пересчитать результаты измерений авторов, то для параметров ячейки лигноцериновой и стеариновой кислот можно получить $a = 0{,}49$ нм и $a = 0{,}47$ нм соответственно, что, в свете результатов рассмотренных выше работ, представляется вполне разумными значениями (и соответствует параметрам «газокристаллического» состояния).

Специфика АСМ-эксперимента по определению молекулярной упаковки поверхности

Метод АСМ позволяет исследовать молекулярную упаковку некоторого выбранного *локального* участка поверхности заданной площади. Эту площадь участка в экспериментах мы выбирали исходя из следующих двух требований.

- Поскольку относительная ошибка измерения латеральных расстояний, обусловленная наличием температурного дрейфа, обратно пропорциональна размеру кадра (см. ниже), то требование минимальности данной ошибки приводит к ограничению размера кадра снизу (как правило, на уровне $20 \times 20 \div 40 \times 40\,\text{нм}^2$).

- Молекулярная упаковка представляет собой двумерную периодическую структуру, а АСМ изображение — массив из $N \times N$ (мы выбирали 512×512) точек. Поэтому, в силу следствий теоремы Котельникова-Шеннона, требование возможности оцифровки картины молекулярной упаковки без потери необходимой информации о пространственном спектре ограничивает размер кадра сверху (как правило, на уровне $70 \times 70 \div 90 \times 90\,\text{нм}^2$)

Поясним выписанные требования.

Основным фактором, ограничивающим точность метода АСМ при исследованиях молекулярной упаковки поверхности твердых тел, является *температурный дрейф* зонда микроскопа относительно образца. Если скорость температурного дрейфа $v_{\textit{дрейф}}$ в направлении оси сканирования сравнима со скоростью перемещения левера в этом направлении, то возникают значительные искажения при измерении расстояния между двумя точками поверхности. В зондовой микроскопии различают направления *быстрого* сканирования (направление сканов) и *медленного* сканирования (перпендикулярное направление, в котором перемещается левер при переходе от скана к скану). В направлении оси *медленного* сканирования левер перемещается в среднем со скоростью $v_{\textit{скан}} = Lf/N$, а в направлении оси *быстрого* сканирования — со скоростью $v_{\textit{скан}} = 2Lf$; здесь L — размер АСМ-изображения (считаем, что $L_x = L_y$), f — частота строчной развертки сканирования, N — число строк в АСМ-изображении. Пусть температурный дрейф направлен вдоль оси медленного сканирования и имеет скорость $v_{\textit{дрейф}}$, и пусть необходимо измерить отрезок длины a, параллельный оси медленного сканирования, тогда ошибка измерения, обусловленная температурным дрейфом, может быть определена следующим образом:

$$\varepsilon = \frac{\Delta x}{a} = \frac{v_{\textit{дрейф}} \times \frac{a}{v_{\textit{скан}}}}{a} = \frac{v_{\textit{дрейф}}}{v_{\textit{скан}}} = \frac{N v_{\textit{дрейф}}}{Lf}; \tag{5.1}$$

аналогично в случае сонаправленности температурного дрейфа, оси быстрого сканирования и измеряемого отрезка получим для ошибки:

$$\varepsilon = \frac{v_{дрейф}}{v_{скан}} = \frac{v_{дрейф}}{2Lf}; \tag{5.2}$$

т.е. относительная ошибка измерения обратно пропорциональна величине кадра L и частоте строчной развертки f. Т.о. для уменьшения искажающего влияния температурного дрейфа эти параметры при сканировании следует, по возможности, увеличивать. Однако эти величины ограничены сверху: так, величина строчной развертки (при $N = 512$) для конкретного прибора, на котором проводили измерения («Nanoscope-IIIa», Digital Instruments), ограничена величиной 60 Гц, что связано со скоростью оцифровки данных аналого-цифровым преобразователем. Размер кадра ограничен требованием возможности дискретизации двумерной периодической структуры без существенной потери информации о пространственном спектре накладывает ограничение на шаг дискретизации, что, при фиксированном N, ограничивает размер кадра L.

Мы обнаружили, что в стандартных условиях эксперимента (без применения термостатирования) искажающее влияние температурного дрейфа может проявляться и при максимально возможных параметрах f и L ($f_{max} = 60$ Гц, $L_{max} \sim 70 \div 80$ нм), что позволяет оценить по формуле (5.1) величину скорости теплового дрейфа: $v_{дрейф} \lesssim 0{,}8$ нм/с[24].

Оказывается, что температурный дрейф характеризуется постоянным направлением. Поскольку он особенно чувствителен в том случае, когда компонента $v_{дрейф}$, направленная вдоль оси медленного сканирования, принимает значительную величину, то мы при сканировании записывали АСМ-изображения парами — при двух взаимнопротивоположных направлениях медленного сканирования. В таком случае при усреднении измеренных параметров элементарной ячейки для первого и второго изображения имеет место взаимокомпенсация, что позволяет исключить влияние температурного дрейфа в направлении оси медленного сканирования. Для уменьшения влияния температурного дрейфа в направлении оси быстрого сканирования мы определяли параметры молекулярной упаковки путем усреднения значительного числа измерений АСМ-изображений, полученных при разной ориентации держателя левера и образца.

[24] $N = 512$, $\varepsilon = 0{,}1$, $f = 60$ Гц, $L = 70$ нм

Усреднение параметров элементарной ячейки на основании нескольких АСМ-изображений позволило свести вносимую дрейфом погрешность в измерениях к ошибке среднего арифметического, и достигнуть точности в определении искомых параметров на уровне нескольких процентов, см. ниже.

Экспериментальная часть

[25] Образцы пленок были приготовлены вертикальным методом (Y-пленки) и методом горизонтального осаждения (Z-пленки) при комнатной температуре ($t \sim 25°$C) и поверхностном давлении π в диапазоне 20–40 мН/м. Монослой, сформированный на поверхности субфазы, осаждали методом ГО на предварительно погруженную под водную поверхность подложку в процессе медленного (около 0,01 мм в минуту) понижения уровня жидкости (рис. 5.1б). Пленки, полученные вертикальным методом ЛБ, формировали при пропускании подложки сквозь монослой вертикально со скоростью 4 мм/мин. Пленкообразующее вещество наносили на поверхность субфазы из раствора в хлороформе (х. ч.). При приготовлении пленок пчелиного воска использовали препарат, очищенный разделением на фракции.

Калибровка прибора. Все эксперименты по определению молекулярной упаковки проводили на приборе «Nanoscope-IIIa» (Digital Instruments, США), оборудованном «D»-сканером (максимальный размер кадра 15 мкм), в контактном режиме с использованием кантилевера жесткостью 0,32 Н/м, см. таблицу А.1. Для калибровки сканера использовали поверхности тест-объектов: слюды и пирографита, для которых измеряли параметры решетки. Полученные значения усредняли по результатам обработки около 100 АСМ-изображений[26], сравнивали с известными параметрами гексагональной упаковки используемых тест-объектов (0,519 нм для слюды и 0,246 нм для графита), и определяли коэффициент калибровки. Полученные значения для коэффициента калибровки совпали для двух типов используемых тест-объектов с точностью до 2%. Измеренные значения характеризовались среднеквадратичной ошибкой

[25] Образцы пленок были приготовлены к. х. н. Г. К. Жавнерко, ИФОХ АН Беларуси, Минск

[26] полученных в режиме измерения сил трения

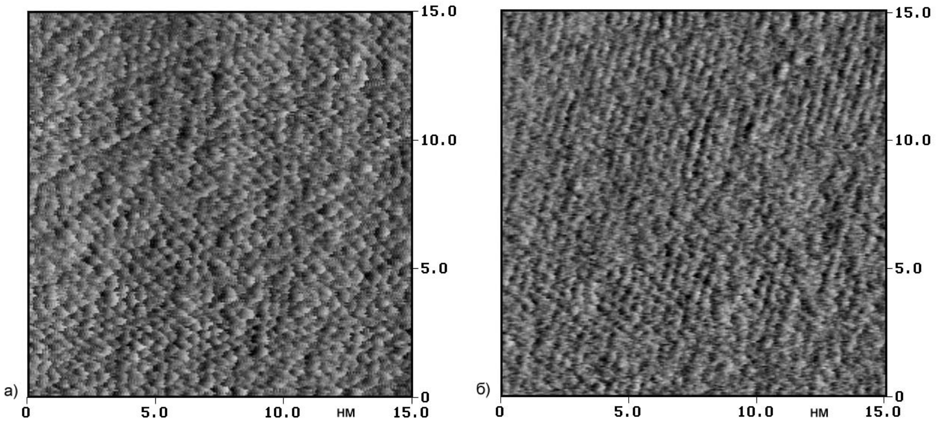


Рис. 5.11. Примеры визуализации молекулярной упаковки тонких пленок бегеновой кислоты.

АСМ-изображение получено в режиме измерения сил трения для: а) поверхности кристаллитов, включенных в монослой бегеновой кислоты на слюде, см. рис. 5.3а; б) поверхности кристаллитов, включенных в монослой бегеновой кислоты на пирографите, см. рис. 5.4

меньше 2%. Таким образом, мы оцениваем, что точность достигнутой калибровки не хуже, чем 2%.

5.3.1. Результаты исследований молекулярной упаковки тонких пленок

Основным препятствием при АСМ-исследованиях молекулярной упаковки тонких пленок являлось локальное разрушение покрытия под воздействием зонда микроскопа при уменьшении размера кадра до 70–80 нм (уменьшение размера кадра приводит к уменьшению скорости[27)] перемещения зонда и, следовательно, увеличению характерного времени взаимодействия зонда и образца, см. раздел 2.1.2 со стр. 56).

Тем не менее, для ряда тонкопленочных покрытий (устойчивых к воздействию зонда) оказалось возможным достичь с помощью АСМ молекулярного разрешения и определить параметры элементарной ячейки. Примеры АСМ-визуализации молекулярных упаковок тонких пленок приведены на рис. 5.11, рис. 5.13 и рис. 5.15.

[27)] при фиксированной частоте строчной развертки

В таблице 5.4 приведены значения средних арифметических для измеряемых параметров, полученные путем усреднения результатов обработки нескольких десятков АСМ-изображений. В качестве погрешности измерения приведена величина *стандартного отклонения* среднего арифметического. Использование этой величины (а не среднеквадратичной ошибки среднего арифметического) обусловлено тем, что исследуемые пленки могут характеризоваться доменной структурой с различными параметрами упаковки; диапазон вариации их значений определяется именно величиной стандартного отклонения.

Бегеновая кислота. Структурная формула: $C_{21}H_{43}COOH$.

Молекулярное разрешение удавалось стабильно получать на поверхностях кристаллитов (3 слоя), спонтанно сформированных в монослоях бегеновой кислоты, переносимой на поверхность подложки (слюда и пирографит) с субфазы, содержащей CdTe-кластеры, см. раздел 5.1.

Было установлено, что молекулярная упаковка верхнего слоя кристаллической структуры на слюде, может быть описана как прямоугольная центрированная (№1 таблицы 5.4). При этом направление вектора $\vec{a}$ совпадает с направлением ламелей кристаллических структур. Т.е. для направления вектора $\vec{a}$ справедливы все результаты, изложенные выше относительно направления ламелей (об углах с кристаллическими осями слюды и о взаимной ориентации ламелей, относящихся к различным кристаллическим структурам, см. гистограммы рис. 5.5а и рис. 5.6а).

Молекулярная упаковка верхнего слоя кристаллической структуры, образованной на поверхности пирографита, также описывается ЦП-решеткой с близкими значениями параметров ячейки (№2 таблицы 5.4). При этом направление вектора $\vec{a}$ также совпадает с направлением ламели (об ориентации ламелей на пирографите см. гистограммы рис. 5.5б и рис. 5.6б).

В обоих случаях параметры решетки близки параметрам для $R[0, \pm 1]$-слоев плотноупакованных молекул н-парафинов (см. таблицу 5.1). Мы обнаружили, что те же параметры характеризуют упаковку молекул монослоя пчелиного воска, перенесенного на поверхность пирографита (№13 таблицы 5.4). Близкие параметры зафиксировали методом АСМ авторы работы [124] для поверхностей кристаллов н-парафинов, а также авторы работы [131] для тонких пленок (более 3-х слоев) бегената и

№, тип	подложка	a, нм	b, нм	b/a	S, нм^2	N
1 ЦП	слюда	$0{,}48 \pm 0{,}03$ $\varepsilon = 6\%$	$0{,}77 \pm 0{,}06$ $\varepsilon = 8\%$	$1{,}59 \pm 0{,}16$ $\varepsilon = 10\%$	$0{,}185 \pm 0{,}017$ $\varepsilon = 9\%$	60
2 ЦП	графит	$0{,}50 \pm 0{,}02$ $\varepsilon = 4\%$	$0{,}78 \pm 0{,}06$ $\varepsilon = 8\%$	$1{,}56 \pm 0{,}14$ $\varepsilon = 9\%$	$0{,}194 \pm 0{,}016$ $\varepsilon = 8\%$	70
3 ЦП	слюда	$0{,}47 \pm 0{,}02$ $\varepsilon = 4\%$	$0{,}88 \pm 0{,}08$ $\varepsilon = 9\%$	$1{,}9 \pm 0{,}2$ $\varepsilon = 11\%$	$0{,}210 \pm 0{,}018$ $\varepsilon = 9\%$	70
4 ЦП	слюда	$0{,}53 \pm 0{,}03$ $\varepsilon = 5\%$	$0{,}77 \pm 0{,}04$ $\varepsilon = 5\%$	$1{,}46 \pm 0{,}13$ $\varepsilon = 9\%$	$0{,}203 \pm 0{,}007$ $\varepsilon = 3\%$	10
5 Г	слюда	$0{,}477 \pm 0{,}014$ $\varepsilon = 3\%$			$0{,}197 \pm 0{,}007$ $\varepsilon = 4\%$	46
6 Г	слюда	$0{,}476 \pm 0{,}018$ $\varepsilon = 4\%$			$0{,}196 \pm 0{,}008$ $\varepsilon = 4\%$	30
7 Г*	слюда	$0{,}477 \pm 0{,}011$ $\varepsilon = 2\%$			$0{,}197 \pm 0{,}006$ $\varepsilon = 3\%$	50
8 ЦП	слюда	$0{,}566 \pm 0{,}015$ $\varepsilon = 3\%$	$0{,}80 \pm 0{,}03$ $\varepsilon = 4\%$	$1{,}42 \pm 0{,}08$ $\varepsilon = 6\%$	$0{,}227 \pm 0{,}011$ $\varepsilon = 5\%$	50
9 Г	слюда	$0{,}482 \pm 0{,}010$ $\varepsilon = 2\%$			$0{,}202 \pm 0{,}005$ $\varepsilon = 5\%$	15
10 ЦП*	слюда	$0{,}548 \pm 0{,}009$ $\varepsilon = 2\%$	$1{,}56 \pm 0{,}08$ $\varepsilon = 5\%$	$2{,}85 \pm 0{,}09$ $\varepsilon = 3\%$	$0{,}427 \pm 0{,}014$ $\varepsilon = 3\%$	20
11а ЦП	слюда	$0{,}548 \pm 0{,}009$ $\varepsilon = 2\%$	$1{,}31 \pm 0{,}06$ $\varepsilon = 5\%$	$2{,}40 \pm 0{,}11$ $\varepsilon = 5\%$	$0{,}360 \pm 0{,}018$ $\varepsilon = 5\%$	67
11б ЦП	слюда	$0{,}550 \pm 0{,}012$ $\varepsilon = 2\%$	$1{,}30 \pm 0{,}07$ $\varepsilon = 6\%$	$2{,}37 \pm 0{,}014$ $\varepsilon = 6\%$	$0{,}36 \pm 0{,}02$ $\varepsilon = 5\%$	45
12 ЦП	слюда	$0{,}508 \pm 0{,}007$ $\varepsilon = 1\%$	$1{,}37 \pm 0{,}08$ $\varepsilon = 5\%$	$2{,}71 \pm 0{,}017$ $\varepsilon = 6\%$	$0{,}35 \pm 0{,}02$ $\varepsilon = 5\%$	40
13 ЦП	графит	$0{,}50 \pm 0{,}04$ $\varepsilon = 7\%$	$0{,}79 \pm 0{,}07$ $\varepsilon = 9\%$	$1{,}6 \pm 0{,}2$ $\varepsilon = 13\%$	$0{,}195 \pm 0{,}015$ $\varepsilon = 8\%$	15

Таблица 5.4. Параметры элементарной ячейки молекулярной упаковки тонких пленок.

Тип: ЦП — центрированная прямоугольная, Г — гексагональная. Расшифровка номеров образцов приведена в таблице 5.5. a, b — параметры ячейки, b/a — их отношение, S — площадь, приходящаяся на углеводородную цепь, N — число проанализированных АСМ-изображений, ε — стандартное отклонение. Значком * отмечены случаи наблюдения сверхструктур.

№	материал пленки	давление π (мН/м)	подложка и способ нанесения	субфаза	сформированное покрытие
1 2 3 4	Бегеновая кислота	30 30 30 30	слюда, ГО графит, ЛБ слюда, ЛБ слюда, ГО	CdTe CdTe CdTe H_2O	ламели ламели монослой монослой
5	N,N'-диоктадецил-пропандиамид	30	слюда, ГО	H_2O	трислой
6	N-гексадецилацет-амид	30	слюда, ГО	H_2O	трислой
7	N,N'-дигексадецил-пропандиамид	25–30	слюда, ГО	H_2O	трислой
8	N-гексадецил-N'-(2-нафтил)пропан-диамид	30	слюда, ГО	H_2O	монослой
9	N-гексадецил-N'-(6-хинолин)про-пандиамид	32–34	слюда, ГО	H_2O	монослой
10 11а 11б 12	5-октадецил-2,4,6 (1H, 3H, 5H) пири-мидинтрион	30 30 35 35	слюда, ГО слюда, ГО слюда, ГО слюда, ГО	H_2O H_2O H_2O H_2O	монослой ламели ламели островки
13	Пчелиный воск	20	графит, ГО	H_2O	монослой

Таблица 5.5. Описание образцов тонких пленок для таблицы 5.4

Горизонтальным методом (ГО) осаждали 1-Z монослои, вертикальным методом (ЛБ) формировали 1-Y бислои. Ряд покрытий претерпевал спонтанную переорганизацию и не сохранял структуру, определяемую процедурой нанесения: в последней колонке таблицы указано для каких именно образований получено молекулярное разрешение лигноцерината кадмия (см. таблицу 5.3). Это позволяет предположить, что молекулярная упаковка поверхности кристаллитов, сформированных в монослоях бегеновой кислоты на CdTe-субфазе, в *незначительной степени* подвержена влиянию подложки (действительно, параметры решетки кристаллитов близки в обоих случаях: пирографитовой подложки и подложки из слюды), но определяется принципом плотной упаковки углеводородных цепей.

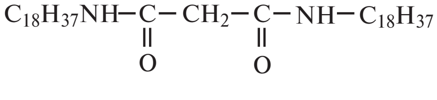
По-видимому, в большей степени влияние подложки проявляется при формировании структуры монослойных пленок бегеновой кислоты, перенесенных на поверхность слюды (№3 и №4 таблицы 5.4). В отличие от авторов работы [132], также исследовавших монослои жирных кислот, перенесенных на подложку с водной субфазы, мы обнаружили не гексагональную («газокристаллическая фаза»), а типичную ЦП-решетку молекулярной упаковки монослоев в этих случаях.

Значение параметра $b = 0{,}77 \pm 0{,}04$ нм молекулярной упаковки монослоя бегеновой кислоты, сформированного методом ГО (№4), близко значению $b = 0{,}785$ нм, определяемому принципом плотной упаковки углеводородных частей молекул для слоев с R-подъячекой, см. таблицу 5.1. При этом значение параметра $a = 0{,}53 \pm 0{,}03$ нм может объясняться влиянием подложки.

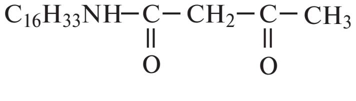
С другой стороны, параметры решетки ($a = 0{,}47 \pm 0{,}02$ нм и $b = 0{,}88 \pm 0{,}08$ нм) монослоя, перенесенного на слюду вертикальным методом ЛБ (№3 таблицы 5.4) близки параметрам, обнаруженным авторами работы [125] для верхнего слоя мультислойных пленок транс-6-октадеценовой кислоты, перенесенных на стекло с $TbCl_3$-субфазы, когда влияние подложки вряд ли может иметь место.

Пленки амфифильных кетоамидов. В таблице 5.4 приведены результаты исследования пленок, сформированных на основе:

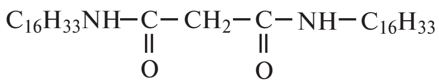
N,N'-диоктадецилпропандиамида (№5)



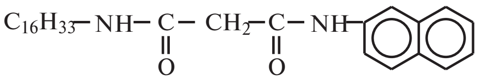
N-гексадецилацетамида (№6)



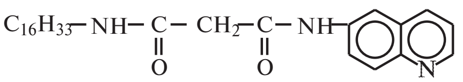
N,N'-дигексадецилпропандиамида (№7)



N-гексадецил-N'-(2-нафтил)пропандиамида (№8)



N-гексадецил-N'-(6-хинолин)пропандиамида(№9)



Изображения структуры исследуемых пленок приведены на рис. 5.12. Соединения №8 и №9 позволяют формировать на своей основе качественные монослои с незначительным количеством дефектов, см. рис. 5.12г и д. В то же время из рисунка видно, что для образцов №5–7, имеет место структурная перестройка молекул пленки с формированием ими образований, высота которых превышает высоту монослоя и составляет величину 5,5–6,0 нм (см. рис. 5.12а–в). Можно предположить, что эти структуры образованы тремя монослоями молекул (высоты тонких пленок по результатам АСМ-исследований занижены в силу контактных деформаций, см. раздел 2.1). С учетом того обстоятельства, что молекулы образцов №5 и №7 имеют по две углеводородных цепи равной длины можно предположить одинаковую ориентацию этих цепей относительно полярной группы молекулы. В пользу этого заключения говорит тот факт, что структура пленки образца №6 сходна с образцами №5 и №7, хотя в первом случае молекула имеет лишь один длинный углеводородный фрагмент.

Было обнаружено (рис. 5.13), что за одним исключением (№8) АСМ-изображения пленок исследованных соединений характеризуются гексагональной упаковкой, с параметром ячейки близким значению 0,48 нм, которое характеризует упаковку слоев $H[0,0]$ (таблица 5.1) углеводородных цепей с гексагональной подъячейкой. При этом упаковка АСМ-изображения образца №7 характеризуется сверхструктурой: в фурье-спектре наблюдается максимум на пространственной частоте 0,826 нм ($a \times \sqrt{3}$) вдоль направления [21], см. рис. 5.13в. В прямом пространстве

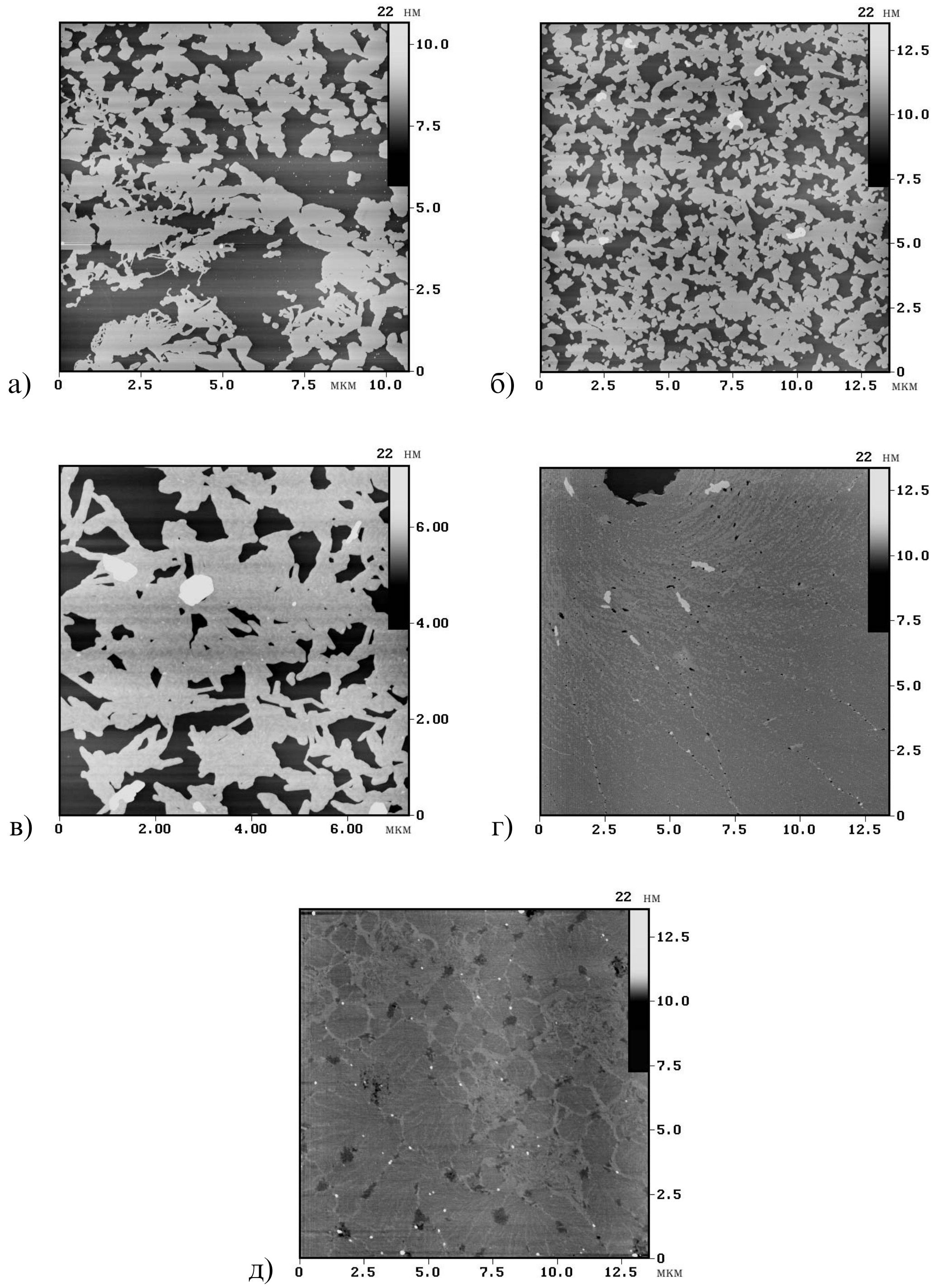


Рис. 5.12. Структура тонких пленок кетоамидов на микронных размерах, АСМ-исследование:

а) N,N'-диоктадецилпропандиамида, б) N-гексадецилацетамида, в) N,N'-дигексадецил-пропандиамида, г) N-гексадецил-N'-(2-нафтил)пропандиамида, д) N-гексадецил-N'-(6-хинолин)пропандиамида

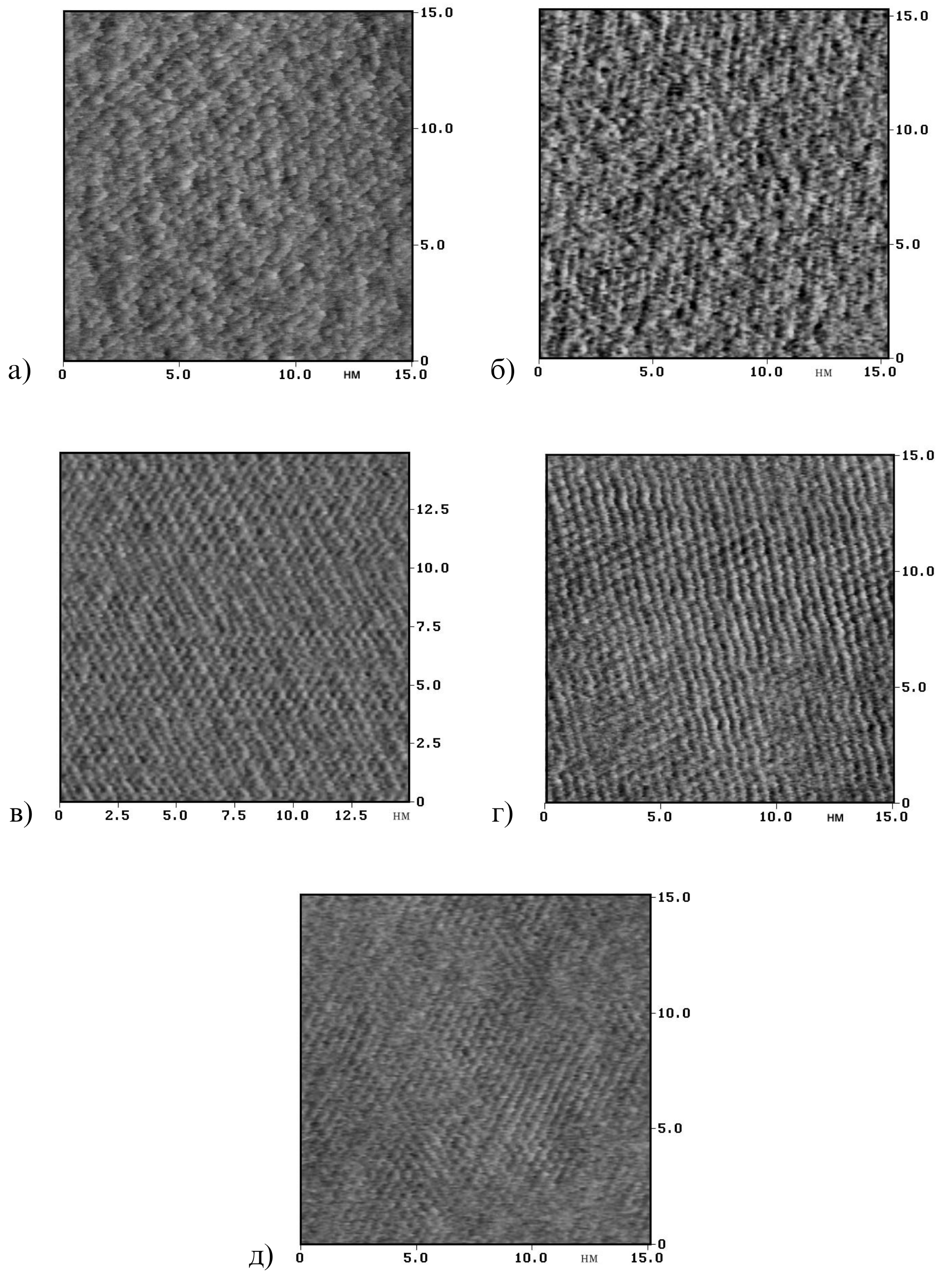


Рис. 5.13. Примеры визуализации молекулярной упаковки тонких пленок кетоамидов.

АСМ-изображение получено в режиме измерения сил трения для поверхностей пленок: а) N,N'-диоктадецилпропандиамида, б) N-гексадецилацетамида, в) N,N'-дигексадецилпропандиамида, г) N-гексадецил-N'-(2-нафтил)пропандиамида, д) N-гексадецил-N'-(6-хинолин)пропандиамида это проявляется в виде чередования яркости[28] АСМ-изображения рядов (через один ряд), перпендикулярных направлению [21].

Мы полагаем, что в этих случаях АСМ-изображение двумерной периодической структуры является отображением упаковки углеводородных цепей. Молекулы образцов №5 и №7 имеют по два углеводородных фрагмента равной длины. Поэтому можно предположить, что каждой молекуле этих соединений на АСМ-изображении структур исследуемых пленок соответствуют *две* пучности. Т.о. мы имеем дело с гексагональной упаковкой углеводородных цепей, причем именно тот факт, что эти цепи попарно объединены в молекулы, возможно, и проявляется в наблюдаемой сверхструктуре (для образца №7).

Факт упаковки углеводородных цепей в гексагональную решетку для молекул, имеющих по два углеводородных «хвоста» является несколько неожиданным. Действительно, согласно имеющимся представлениям [123] гексагональная упаковка углеводородных цепей в слой $H[0, 0]$ не характеризуется высокой плотностью: молекулы в слое ориентированы вертикально, но в то же время молекулярная площадь составляет около $0{,}2\,нм^2$, тогда как более плотные упаковки вертикально ориентированных молекул могут характеризоваться значением площади $0{,}18\,нм^2$. Считается, что молекулы в слое $H[0, 0]$ сохраняют некоторую свободу вращения вокруг вертикальной оси, что приводит к аксиальной симметрии области, занимаемой молекулой, и обуславливает высокую симметрию молекулярной упаковки[29]. Поэтому для объяснения высокой симметрии упаковки в нашем случае следует допустить, что два углеводородных хвоста молекул исследуемых структур сохраняют возможность независимого вращения вокруг своей оси.

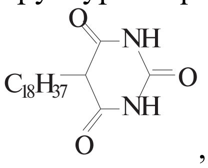
Отдельно стоит отметить, что молекулярная упаковка пленки на основе соединения №9 характеризуется относительной неоднородностью и направления векторов трансляции различны в пределах различных участков пленки, причем размеры участков фиксированной ориентации составляют лишь сотни квадратных нанометров. При этом четко визуализировать границы доменов не удавалось, что, по-видимому, обуслов-

[28] как показали контрольные измерения с различными зондами, это наблюдение не может быть связано с артефактами АСМ, рассмотренными в разделе 2.1.5

[29] Это состояние органического вещества называют [123] ротационно-кристаллическим или «газокристаллическим» состоянием.

лено изложенными в разделе 2.1.5 выводами относительно «ложности» молекулярного разрешения в АСМ при типичных параметрах эксперимента на воздухе.

Сосуществование различных типов упаковок в структуре пленки 5-октадецил-2,4,6(1Н, 3Н, 5Н)пиримидинтриона. Для этого соединения, структурная формула которого:



, мы обнаружили три различных типа упаковки, см. таблицу 5.4: для монослоя (№10, таблица 5.4), для кристаллитов (№11) и для островковых образований (№12).

Структура пленки визуализирована методом АСМ на рис. 5.14, где изображены области различной структурной организации сформированных покрытий: монослой, островки и ламели. Анализ высот показывает, что островки сформированы, по-видимому, двумя слоями пленки (высота этих образований около 4 нм, высота монослоя 1,5–2 нм), в то время как кристаллиты (ламели) образованы 3, 6 или 9 слоями (высоты около 5,3–5,7 нм, а также удвоенные и утроенные значения.)

Молекулярная упаковка островковых и кристаллических образований характеризовалась центрированной прямоугольной ячейкой с отличающимися параметрами a и b, но близкими значениями площади, приходящейся на молекулу, см. таблицу 5.4.

В то же время АСМ-изображение молекулярной упаковки монослоя характеризовалось, во-первых, сверхструктурой (рис. 5.15а), а во-вторых, большей площадью на молекулу. Последнее может объясняться влиянием подложки. Действительно, мы обнаружили, что направление вектора $\vec{b}$ для монослойного покрытия в этом случае совпадает с одной из кристаллографических осей слюды. Периодичность упаковки пленки вдоль этого направления характеризовалась значением 1,56 нм, в то время как значение этого параметра для подложки 0,519 нм, что в три раза меньше. Таким образом имеет место формирование монослоем решетки, один из параметров которой соизмерим с параметром решетки подложки (второй параметр пленки имеет то же значение, что и для кристаллических ламелярных структур).

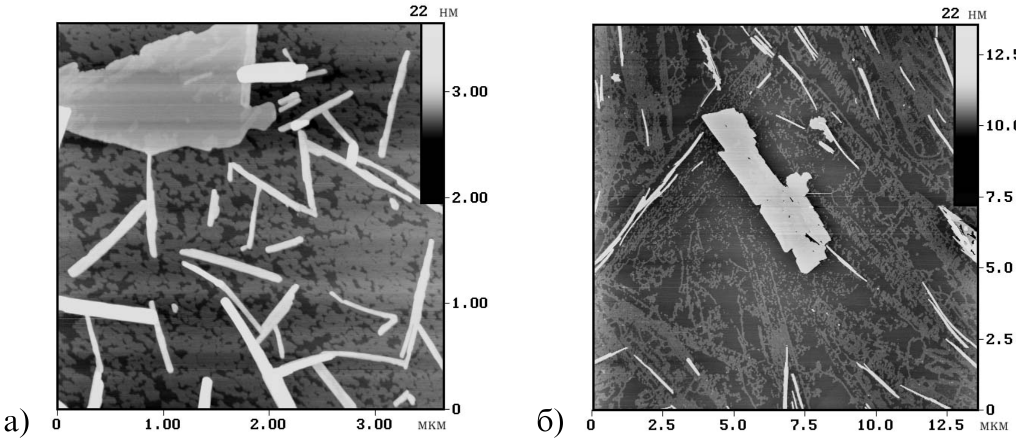


Рис. 5.14. Структура тонких пленок 5-октадецил-2,4,6(1H, 3H, 5H)пиримидинтриона на микронных размерах; АСМ-исследование.

Визуализированы участки различной структуры пленки: монослой, островки и кристаллиты (ламели). Образцы получены при различном поверхностном давлении выделения: а) $\pi = 35\,$мН/м, б) $\pi = 30\,$мН/м

Общие закономерности визуализации молекулярной структуры тонких органических пленок методом АСМ

Успешная визуализация молекулярной структуры пленки возможна лишь при условии достаточно прочной связи молекул пленки друг с другом и с подложкой (что позволяет проводить неразрушающие исследования). Эта связь может возникнуть в результате следующих причин. Во-первых, за счет гидрофобного взаимодействия алкильных участков молекул и гидрофобной подложки. Это позволило нам наблюдать молекулярную упаковку пленок пчелиного воска (№13 таблицы 5.4). Во-вторых, за счет процессов спонтанной кристаллизации или самоорганизации молекул пленки, приводящих к формированию плотноупакованных структур, характеризующихся высокой связанностью молекул (№1, №2, №5–7, №11 и №12 таблицы 5.4).

В отсутствие этих факторов достижение молекулярного разрешения методом АСМ остается сложной задачей: структура пленки разрушается под воздействием зонда микроскопа при уменьшении размера кадра[30) несмотря на минимизацию силового взаимодействия зонда и образца.

[30) при уменьшении размера кадра уменьшается скорость сканирования и увеличивается характерное взаимодействие зонда с локальным участком образца

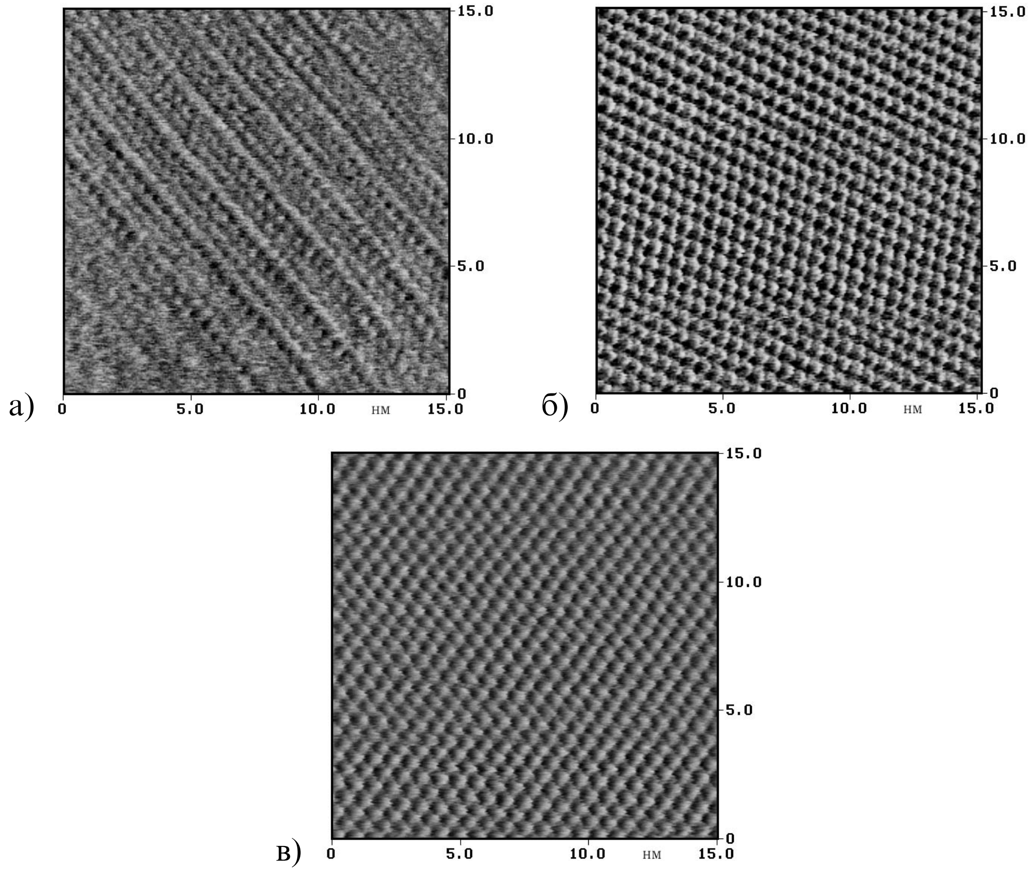


Рис. 5.15. Примеры визуализации молекулярной упаковки пленок 5-октадецил-2,4,6(1H, 3H, 5H)пиримидинтриона;

АСМ-изображение получено в режиме измерения сил трения для поверхностей различных участков пленки: а) монослойного покрытия (№10), б) кристаллических (№11) и в) островковых (№12) образований

Возможно, решить эту проблему удастся при проведении исследований в жидких средах.

Тем не менее, в тех случаях, когда пленка характеризовалась достаточной прочностью, что позволяло проводить неразрушающие исследования малого локального участка поверхности на воздухе, оказалось возможным определить молекулярную структуру ряда *монослойных* тонкопленочных покрытий (№3, №4, №8–10).

Было обнаружено, что для многих пленок параметры ячейки подчиняются принципу плотной упаковки углеводородных цепей молекул (ср. с таблицей 5.1). Так, образцы №1, №2, №13 характеризуются ЦП-решеткой с параметрами, близкими параметрам слоя $R[0, \pm 1]$ плотноупакованных молекул н-парафинов (таблица 5.1). В свою очередь молекулярные пленки образцов №5–7 и №9 характеризуются гексагональной упаковкой и параметр ячейки близок значению для слоя $H[0, 0]$ (таблица 5.1) «газокристаллической» фазы н-парафинов.

С другой стороны молекулярная структура пленок №10–12 не может быть обусловлена принципом плотной упаковки углеводородных цепей. Площадь, приходящаяся на молекулу, в этом случае (0,35–0,36 нм^2) значительно превышает площадь поперечного сечения углеводородной цепи (около 0,18 нм^2). По-видимому, в этом случае параметры решетки определяются значением площади, занимаемой полярной группой на поверхности субфазы.

Наряду с этим отличие, наблюдаемое для ряда пленок, параметров упаковки от значений, реализующих плотную упаковку углеводородных групп, может быть обусловлено и влиянием подложки. В частности, мы обнаружили формирование молекулами монослоя решетки с параметрами, соизмеримыми с параметрами подложки (№10).

Т.о. мы показали, что параметры молекулярной упаковки тонких пленок определяются несколькими конкурирующими факторами: принципом плотной упаковки углеводородных цепей, значением площади полярной группы и влиянием подложки.

Заключение

Целью проведенных исследований служила разработка зондово-микроскопических методов исследования нуклеиновых кислот. Попутно, при решении задач контролируемой модификации свойств подложки для иммобилизации нуклеиновых кислот, были затронуты вопросы, связанные с тонкими органическими пленками: выяснение основных механизмов, определяющих структуру покрытия.

Исследования органических пленок, сформированных по технологии ЛБ, показали, что они являются весьма перспективным объектом для СЗМ-анализа, поскольку методы зондовой микроскопии могут позволить получить здесь принципиально новую информацию. Поэтому мы провели ряд исследований тонкопленочных покрытий (глава 5) в которых эти структуры являлись *основным* объектом исследования (безотносительно к нуклеиновым кислотам). В экспериментах мы анализировали влияние процедуры выделения пленки, состава субфазы и природы подложки как на микроструктуру пленки (дефектность и однородность на микронных размерах поверхности), так и на молекулярную упаковку молекул в сформированных покрытиях.

Возможность достижения молекулярного разрешения при исследовании плоских поверхностей (тонких пленок, кристаллических подложек), и невозможность достижения столь же высокого латерального пространственного разрешения в исследованиях нуклеиновых кислот и вирусных частиц, требовали объяснения. Вопрос о механизме достижения «атомного» разрешения в АСМ возник и в свете результатов применения теории контактных деформаций для описания контакта зонда и образца (раздел 2.1 — учет эффекта занижения высот АСМ-изображений объектов). Действительно, согласно соотношениям Герца этой теории, размер области контакта зонда и образца при типичных условиях АСМ-исследований на воздухе составляет единицы квадратных нанометров и значительно превышает, например, типичную площадь на молекулу в ЛБ пленках $\sim 0{,}2\,\text{нм}^2$. В разделе 2.1.5 механизм АСМ-визуализации атомной структуры поверхности был обоснован с позиций контактной теории, что позволило объяснить ряд экспериментально наблюдаемых закономерностей.

С использованием соотношений Герца удалось разработать методику определения упругих параметров отдельных микрообъектов, адсорбированных на поверхность твердой подложки. Эта методика нашла отражение в экспериментальной части задачи[31] «Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот» специального физического практикума по зондовой микроскопии кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ. Измерения по результатам АСМ-эксперимента, проводимые студентами, подтвердили, в частности, что деформации микрообъектов с характерными размерами $\sim 10\,\text{нм}$ (и более) хорошо описываются теорией контактных деформаций.

Перспективы применения разработанных подходов

Алгоритм построения численного решения для учета эффекта уширения, разработанный в разделе 2.2, представляется весьма простым в реализации, а проведение расчетов фактически не требует каких-либо затрат компьютерного времени. Это позволяет надеяться, что предложенная методика найдет применение среди специалистов, занимающихся зондовой микроскопией биоструктур. Среди отличительных особенностей реализованного подхода стоит упомянуть его общность («эллипсоидальный» объект[32]), а также наличие «реперных» соотношений (2.38) и (2.39), позволяющих оценить «остроту» самого зонда непосредственно по анализируемому АСМ-изображению.

Логическим обобщением результатов четвертой и пятой глав стали проводимые нами в последнее время исследования влияния молекул ДНК и синтетических полиэлектролитов, присутствующих в субфазе, на свойства ленгмюровских пленок поверхностно-активных веществ, находящихся на поверхности жидкой субфазы (и переносимых для АСМ-

[31] задача поставлена автором совместно с д. ф.-м. н. И. В. Яминским

[32] в отличие от традиционно используемой модели сферического объекта

исследований на твердую подложку). Полученные результаты[33] носят предварительный характер (и не вошли в диссертацию), однако позволяют сделать вывод о высокой чувствительности структуры и свойств сформированных монослоев к природе объектов, находящихся в субфазе. Различие во влиянии, оказываемом молекулами ДНК и синтетическими полиэлектролитами (полиметакриловой кислоты) на структуру монослоев позволяет констатировать различие механизмов их взаимодействия с ПАВ.

Результаты проводимых нами исследований тонких пленок свидетельствуют о большом потенциале метода АСМ в этой области (это частично отражено в диссертации). Действительно, позволяя непосредственно «видеть» структуру поверхности и измерять ее характерные параметры, метод АСМ служит удачным дополнением других физических методов исследования тонких пленок. Это позволяет адекватно интерпретировать результаты комплексных исследований. Представляется, что набор достаточного количества фактических экспериментальных данных позволит, при их анализе и обобщении, сделать фундаментальные выводы относительно основных механизмов, определяющих структуру тонкопленочных покрытий. Есть все основания полагать, что метод зондовой микроскопии найдет в ближайшее годы широкое применение в этой области исследований и результаты, изложенные в работе, будут полезны при обобщающем анализе.

Определение адекватной методики иммобилизации одноцепочечной вирусной РНК (глава 3) на поверхности подложки позволяет нам в настоящее время проводить исследования биоспецифического взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. Разработанные подходы могут быть полезны в актуальных микробиологических исследованиях, проводимых в условиях, максимально близких нативным.

В заключении сформулируем основные выводы по результатам, изложенным в диссертационной работе. Эти положения выносятся на защиту.

[33] Доложены на XVI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии: О. А. Пышкина, Е. А. Барышникова, М. О. Галлямов, В. Г. Сергеев, И. В. Яминский. Свойства и морфология комплексов ДНК или полиметакриловой кислоты с катионным ПАВ в монослоях // Рефераты докладов и сообщений №2, — С.-Петербург, 1998, — с. 451.

Выводы

1. Разработаны модели и построены алгоритмы учета двух основных *артефактов* АСМ: эффектов *уширения* и *занижения высоты* профиля одиночных объектов, адсорбированных на поверхность твердой подложки. Предложена методика определения упругих параметров отдельного микрообъекта. С позиции теории контактных деформаций проанализирован механизм АСМ-визуализации атомной структуры поверхности.

2. Апробирована методика иммобилизации на поверхности подложки свободных молекул однонитевой вирусной РНК в расправленном состоянии. Методом АСМ визуализированы стадии процесса высвобождения РНК из белковой оболочки частиц вируса табачной мозаики и подтверждена асимметрия протекания этого процесса относительно двух концов молекулы.

3. Методом АСМ исследована динамика процесса компактизации молекулы ДНК Т4 в водно-спиртовых средах, визуализированы молекулы, находящиеся на различной стадии компактизации. Обнаружено, что частично компактизованные структуры включают тороидальные участки, образованные отдельными витками молекулы. По результатам измерений АСМ восстановлена реальная геометрия компактных структур и рассчитан их молекулярный состав.

4. По результатам АСМ-исследований структуры ЛБ пленок показана перспективность метода горизонтального осаждения монослоев на подложку. Для ряда тонкопленочных покрытий получено молекулярное разрешение и определены параметры решетки с погрешностью в единицы процентов. Показано, что структура пленки определяется несколькими факторами: принципом плотной упаковки углеводородных цепей, значением площади полярной группы на поверхности субфазы и влиянием подложки.

Благодарность

Приношу глубокую благодарность своим научным руководителям — Василию Васильевичу Потемкину и Игорю Владимировичу Яминскому — за постоянное внимание, поддержку и помощь в работе. Также выражаю признательность Алексею Ремовичу Хохлову и Игорю Владимировичу Яминскому за предоставленную возможность использования экспериментального оборудования. Я в неоплатном долгу перед коллегами по совместным исследованиям — Юрием Федоровичем Дрыгиным, Ольгой Александровной Пышкиной, Владимиром Глебовичем Сергеевым, Геннадием Константиновичем Жавнерко, затратившим огромное количество усилий и творческой энергии на разработку и постановку экспериментов, результаты которых нашили отражение в диссертации. Многие ценные замечания по прочитанной рукописи были высказаны Юрием Федоровичем Дрыгиным и Геннадием Константиновичем Жавнерко, за что им искреннее спасибо. Хочу поблагодарить студентов Химического факультета МГУ — Барского Артема, Зинченко Анатолия, Андрееву Асю, а также аспирантку Чалмерского технологического университета Малин Ардхаммар — за помощь в проведении исследований. Я признателен всем сотрудникам, аспирантам и студентам объединенной группы зондовой микроскопии за теплую творческую атмосферу, в значительной степени способствовавшую выполнению работы. Не могу не упомянуть отдельно труд Александра Сергеевича Филонова по созданию высокоинтеллектуального программного обеспечения, облегчившего обработку экспериментальных результатов.

Мне особенно приятно выразить благодарность моей жене Оле, которая взяла на себя основные заботы о сыне Эльдаре и значительный труд по правке языка рукописи, и которой принадлежит основная заслуга в том, что эта работа была завершена.

Спасибо.

Библиография

[1] G. Binnig and H. Rohrer, Scanning tunneling microscopy // *Helv. Phys. Acta.*, — 1982, — v. 55, — pp. 726–735.

[2] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel, Tunneling through a controllable vacuum gap // *Appl. Phys. Lett.*, — 1982, — v. 40, — pp. 178–180.

[3] Г. Бинниг, Г. Рорер, Сканирующая туннельная микроскопия — от рождения к юности // *УФН*, — 1988, — т. 154, — №2, — сс. 261–277.

[4] N. S. Maslova, A. I. Oreshkin, V. I. Panov, S. V. Savinov, A. A. Kalachev, and J. P. Rabe, STM evidence of dimensional quantization on the nanometer size surface defects // *Solid State Communications*, — 1995, — v. 95, — №8, — pp. 507–510.

[5] G. Binning, C. F. Quate, and C. Gerber, Atomic force microscopy // *Phys. Rev. Lett.*, — 1986, — v. 56, — №9, — pp. 930–933.

[6] C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthod, and R. Keller, Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy // *Biochemistry*, — 1992, — v. 31, — pp. 22–26.

[7] G. U. Lee, L. A. Chrisey, and R. J. Colton, Direct measurements of the forces between complementary strands of DNA // *Science*, — 1994, — v. 266, — pp. 771–773.

[8] M. Guthold, M. Bezanilla, D. A. Erie, B. Jenkins, H. G. Hansma, and C. Bustamante, Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, — 1994, — v. 91, — №26, — pp. 12927–12931.

[9] J. J. Saens, N. Garcia, P. Grutter, E. Meyer, H. Heinzelmann, R. Wiezendanger, L. Rosenthaler, H. R. Hidber, and H. J. Guntherodt, Observation of magnetic forces by the atomic force microscope // *J. Appl. Phys.*, — 1987, — v. 63, — pp. 4293–4295.

[10] U. Durug, D. W. Pohl, and F. Rohrer, Near field optical scanning microscopy // *J. Appl. Phys.*, — 1986, — v. 59, — pp. 3318–3327.

[11] J. Hu, X.-D. Xiao, D. F. Ogletree, and M. Salmeron, Imaging the condensation and evaporation of molecularly thin film of water with nanometer resolution // *Science*, — 1995, — v. 268, — pp. 267–269.

[12] С. В. Савинов, *Сканирующая туннельная микроскопия и спектроскопия тонких пленок на поверхности графита*. Автореф. дис. . . . канд. физ.-мат. наук., Физический ф-т МГУ, — М., 1993. — 14 с.

[13] J. G. Simmons, Generalized formula for the electronic tunnel effect between similar electrodes separated by a thin insulating film // *J. Appl. Phys.*, — 1963, — v. 34, — pp. 1793–1803.

[14] R. M. Feenstra, J. A. Stroscio, and A. P. Fein, Tunneling spectroscopy of the Si(111)2×1 surface // *Surf. Sci.*, — 1987, — v. 181, — pp. 295–306.

[15] H. C. Hamaker, // *Physica*, — 1937, — v. 4, — pp. 1058.

[16] F. London, // *Z. Phys. Chem.*, — 1930, — v. B11, — pp. 222.

[17] Б. В. Дерягин, Н. В. Чураев, В. М. Муллер, *Поверхностные силы*. — М.: Наука, 1985. — 398 с.

[18] Е. М. Лифшиц, // *ЖЭТФ*, — 1955, — т. 29, — сс. 94.

[19] U. Hartmann, Theory of van der Waals microscopy // *J. Vac. Sci. Technol. B*, — 1991, — v. 9, — №2, — pp. 465–469.

[20] А. Адамсон, *Физическая химия поверхностей*. — М.: Мир, 1979. — 568 с.

[21] J. T. Woodward, J. A. N. Zasadzinski, and P. K. Hansma, Precision height measurements of freeze fracture replicas using the scanning tunneling microscope // *J. Vac. Sci. Technol B*, — 1991, — v. 9, — №2, — pp. 1231–1235.

[22] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*. — London: Academic Press, 1985. — 296 p.

[23] V. V. Yaminsky and B. W. Ninham, The hydrophobic force: the lateral enhancement of subcritical fluctuations // *Langmuir*, — 1993, — v. 9, — pp. 3618.

[24] R. M. Overney, E. Meyer, J. Frommer, and H.-J. Guntherodt, Force microscopy study of friction and elastic compliance of phase-separated organic thin films // *Langmuir*, — 1994, — v. 10, — №4, — pp. 1281–1286.

[25] G. Bar, S. Rubin, A. N. Parikh, B. I. Swanson, T. M. Zawodzinski, and M.-H. Whangbo, Scanning force microscopy study of patterned monolayers of alkanethiols on gold. Importance of tip-sample contact area in interpreting force modulation and friction force microscopy images // *Langmuir*, — 1997, — v. 13, — №3, — pp. 373–377.

[26] M. F. Perutz, M. G. Rossman, A. Cullis, H. Muirhead, G. Will, and A. C. T. North, // *Nature*, — 1960, — v. 185, — pp. 415.

[27] J. D. Watson and F. H. Crick, Molecular structure of nucleic acids // *Nature*, — 1953, — v. 171, — pp. 737–738.

[28] А. И. Китайгородский, *Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел*. — М., Ленинград: Гос. изд-во технико-теоретической литературы, 1952. — 588 с.

[29] *Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот (под ред. Ю. С. Лазуркина)*. — М.: Наука, 1967. — 322 с.

[30] C. E. Hall, // *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, — 1955, — v. 1, — pp. 1.

[31] A. K. Kleinschmidt and R. K. Zahn, Uber desoxyribonucleinsaure-molekulen in protein mischfilmen // *Zeitschrift fur Naturforschung*, — 1959, — v. 14b, — pp. 770–779.

[32] A. K. Kleinschmidt, *Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acids molecules*, — v. XII of *Methods in Enzymology*. — New York: Academic Press, 1968.

[33] Д. И. Черный, *Электронно-микроскопические исследования специфических комплексов ДНК.* Автореф. дис. ... докт. биол. наук, Институт молекулярной генетики РАН, — М., 1999. — 50 с.

[34] D. V. Klinov, I. V. Lagutina, V. V. Prokhorov, T. Neretina, P. P. Khil, Y. B. Lebedev, D. I. Cherny, V. V. Demin, and E. D. Sverdlov, High resolution mapping DNAs by R-loop atomic force microscopy // *Nucleic Acids Research*, — 1998, — v. 26, — №20, — pp. 4603–4610.

[35] H. G. Hansma, K. A. Browne, M. Bezanilla, and T. C. Bruice, Bending and staightening of DNA induced by the same ligand: characterization with the atomic force microscope // *Biochemistry*, — 1994, — v. 33, — pp. 8436–8441.

[36] W. A. Rees, R. W. Keller, J. P. Vesenka, G. Yang, and C. Bustamante, Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy // *Science*, — 1993, — v. 260, — pp. 1646–1649.

[37] G. Travaglini, H. Rohrer, M. Amrein, and H. Gross, Scanning tunneling microscopy on biological matter // *Surf. Sci.*, — 1987, — v. 181, — pp. 380–390.

[38] D. D. Dunlap and C. Bustamante, Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunneling microscopy // *Nature*, — 1989, — v. 342, — pp. 204–206.

[39] C. R. Clemmer and T. P. Beebe, Graphite: A mimic for DNA and other biomolecules in scanning tunneling microscopes studies // *Science*, — 1991, — v. 251, — pp. 640–642.

[40] W. M. Heckl and G. Binnig, Domain walls on graphite mimic DNA // *Ultramicroscopy*, — 1992, — v. 42–44, — pp. 1073–1078.

[41] J. Vesenka, M. Guthod, C. L. Tang, R. Keller, E. Delaine, and C. Bustamante, Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope // *Ultramicroscopy*, — 1992, — v. 42–44, — pp. 1243–1249.

[42] T. Thundat, D. P. Allison, R. J. Warmack, G. M. Brown, K. B. Jacobson, J. J. Schrick, and T. L. Ferrell, Atomic force microscopy

of DNA on mica and chemically modified mica // *Scanning Microscopy*, — 1992, — v. 6, — №4, — pp. 911–918.

[43] N. H. Thomson, S. Kasas, B. Smith, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging // *Langmuir*, — 1996, — v. 12, — №24, — pp. 5905–5908.

[44] M. N. Murray, H. G. Hansma, M. Bezanilla, T. Sano, D. F. Ogletree, W. Kolbe, C. L. Smith, C. R. Cantor, S. Spengler, P. K. Hansma, and M. Salmeron, Atomic force microscopy of biochemically tagged DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, — 1993, — v. 90, — pp. 3811–3814.

[45] J. Hu, M. Wang, H.-U. G. Weier, P. Frantz, W. Kolbe, D. F. Ogletree, and M. Salmeron, Imaging of single extended DNA molecules on flat (aminopropyl)triethoxysilane-mica by atomic force microscopy // *Langmuir*, — 1996, — v. 12, — №7, — pp. 1697–1700.

[46] Y. L. Lyubchenko, A. A. Gall, L. S. Shlyakhtenko, R. E. Harrington, B. L. Jacobs, P. I. Oden, and S. M. Lindsay, Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, — 1992, — v. 10, — №3, — pp. 589–606.

[47] Y. L. Lyubchenko, B. L. Jacobs, and S. M. Lindsay, Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurements // *Nucleic Acids Research*, — 1992, — v. 20, — №15, — pp. 3983–3986.

[48] Y. Lyubchenko, L. Schlyakhtenko, R. Harrington, and P. Oden, Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, — 1993, — v. 90, — pp. 2137–2140.

[49] В. В. Прохоров, Д. В. Клинов, Е. В. Юркова, В. В. Демин, Исследование возможностей атомно-силовой микроскопии при картировании ДНК // *Материалы 16-ой Российской конференции по электронной микроскопии*, — 1996, — сс. 227.

[50] H. G. Hansma, J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, P. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, and P. K. Hansma, Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with atomic force microscopy // *Science*, — 1992, — v. 256, — pp. 1180–1184.

[51] J. Yang and Z. Shao, The effect of probe force on the resolution of atomic force microscopy of DNA // *Ultramicroscopy*, — 1993, — v. 50, — pp. 157–170.

[52] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, and V. B. Elings, Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy // *Surf. Sci. Lett.*, — 1993, — v. 290, — pp. L688–L692.

[53] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, and V. Elings, Tapping mode atomic force microscopy in liquids // *Apll. Phys. Lett.*, — 1994, — v. 64, — pp. 1738–1740.

[54] H. G. Hansma, D. E. Laney, M. Bezanilla, R. L. Sinsheimer, and P. K. Hansma, Application for atomic force microscope of DNA // *Biophisical Journal*, — 1995, — v. 68, — pp. 1672–1677.

[55] J. Yang, K. Takeyasu, and Z. Shao, Atomic force microscopy of DNA molecules // *FEBS Lett.*, — 1992, — v. 301, — pp. 173–176.

[56] A. Schaper, L. I. Pietrasanta, and T. M. Jovin, Scanning force microscopy of circular and linear plasmid DNA spread on mica with a quaternary ammonium salt // *Nucleic Acids Res.*, — 1993, — v. 21, — №25, — pp. 6004–6009.

[57] F. Jelen, V. Vetterl, A. Schaper, T. Jovin, and E. Palacek, Two-dimensional condensation of benzalkonium chloride at the mercury electrode and its relation to DNA imaging using scanning force microscopy // *J. Electroanal. Chem.*, — 1994, — v. 377, — pp. 197–203.

[58] A. Schaper, J. P. P. Starink, and T. M. Jovin, The scanning force microscopy of DNA in air and in n- propanol using new spreading agents // *FEBS Letters*, — 1994, — v. 355, — pp. 91–95.

[59] H. Butt, T. Muller, and H. Gross, Immobilized biomolecules for scanning force microscopy by embedding in carbon // *Journal of Structural Biology*, — 1993, — v. 110, — pp. 127–132.

[60] L. A. Bottomley, J. N. Haseltine, D. P. Allison, R. J. Warmack, T. Thundat, R. A. Sachlebe, G. M. Brown, R. P. Woychik, K. B.

Jacobson, and T. L. Ferrell, Scanning tunneling microscopy of DNA: The chemical modification of gold surfaces for immobilization of DNA // *J. Vac. Sci. Technol. A*, — 1992, — v. 10, — №4, — pp. 591–595.

[61] D. P. Allison, T. Thundat, K. B. Jacobson, L. A. Bottomley, and R. J. Warmack, Imaging entire genetically functional DNA molecules with the scanning tunneling microscope // *J. Vac. Sci. Technol A*, — 1993, — v. 11, — №4, — pp. 816–819.

[62] D. Dunlap, Scanning tunneling microscopy of DNA // *IEEE engenering in medecine and biology*, — 1996, — v. 15, — №1, — pp. 46–50.

[63] R. Guckenberger, M. Heim, G. Cevc, H. F. Knapp, W. Wiegrabe, and A. Hillebrand, Scanning tunneling microscopy of insulators and biological specimens based on lateral conductivity of ultrathin water films // *Science*, — 1994, — v. 266, — pp. 1538–1540.

[64] Д. В. Клинов, *Исследование биополимеров методами сканирующей зондовой микроскопии*. Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук, МФТИ, — М., 1997. — 20 с.

[65] Z. Shao, J. Mou, D. M. Czajkowsky, J. Yang, and J.-Y. Yuan, Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed // *Advances in Physics*, — 1996, — v. 45, — №1, — pp. 1–86.

[66] H. Herz, // *J. Reine Angew. Math.*, — 1882, — v. 92, — pp. 156.

[67] Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц, *Теория упругости*, — т. VII серии *Теоретическая физика*. — М.: Наука, 1987. — 246 с.

[68] *Физические величины, справочник*. — М.: Энергоатомиздат, 1991. — 1231 с.

[69] Г. Б. Двайт, *Таблицы интегралов*. — М.: Наука, 1973. — 228 с.

[70] Н. С. Бахвалов, Н. П. Жидков, Г. М. Кобельков, *Численные методы*. — М.: Наука, 1987. — 598 с.

[71] G. Binnig, Force microscopy // *Ultramicroscopy*, — 1992, — v. 42–44, — pp. 7–15.

[72] V. Koutsos, E. Manias, G. ten Brinke, and G. Hadziioannou, Atomic force microscopy and real atomic resolution. Simple computer simulations // *Europhys. Lett.*, — 1994, — v. 26, — №3, — pp. 103–107.

[73] M. Komiyama, S. Ohkubo, K. Tazawa, K. Tsujimichi, A. Hirotani, M. Kubo, and A. Miyamoto, Effect of atomic arrangement at tip apex and tip-sample distance on atomic force microscopy images: a simulation study // *Jpn. J. Appl. Phys.*, — 1996, — v. 35, — №4A, — pp. 2318–2325.

[74] S. Banerjee, M. K. Sanyal, and A. Datta, A simulation study of multi-atom tips and estimation of resolution in atomic force microscopy // *Applied surface science*, — 1996, — v. 99, — №3, — pp. 255–260.

[75] K. L. Westra and D. J. Thomson, Atomic force microscopy tip radius needed for accurate imaging of thin film surfaces // *J. Vac. Sci. Technol. B*, — 1994, — v. 12, — №6, — pp. 3176–3181.

[76] А. А. Бухараев, Д. В. Овчинников, А. А. Бухараева, Диагностика поверхности с помощью сканирующей силовой микроскопии // *Заводская лаборатория*, — 1997, — №5, — сс. 10–27.

[77] V. J. Garcia, L. Martinez, J. M. Briceno-Valero, and C. H. Schilling, Dimensional metrology of nanometric spherical particles using AFM: II, application of model — tapping mode // *Probe Microscopy*, — 1998, — v. 1, — №2, — pp. 117–125.

[78] K. L. Westra, A. W. Mitchell, and D. J. Thomson, Tip artifact in atomic-force microscope imaging of thin film surfaces // *J. Appl. Phys.*, — 1993, — v. 74, — №5, — pp. 3608–3610.

[79] J. S. Villarrubia, Morphological estimation of tip geometry for scanned probe microscopy // *Surface Science*, — 1994, — v. 321, — №3, — pp. 287–300.

[80] Y. F. Drygin, O. A. Bordunova, M. O. Gallyamov, and I. V. Yaminsky, Atomic force microscopy examination of TMV and virion RNA // *FEBS letters*, — 1998, — v. 425, — pp. 217–221.

[81] H. G. Hansma, I. Revenko, K. Kim, and D. E. Laney, Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and

triple-stranded nucleic acids // *Nucleic Acids Research*, — 1996, — v. 24, — №4, — pp. 713–720.

[82] R. G. Milna, // in *Principles and Techniques in Plant Virology* (C. I. Kado and H. O. Agrawal, eds.), — pp. 76–128, — New York: VNR, 1972.

[83] A. Nicolaieff, G. Lebeurier, M.-C. Morel, and L. Hirth, The uncoating of native and reconstituted TMV by dimethylsulphoxide: the polarity of stripping // *J. gen. Virol.*, — 1975, — v. 26, — pp. 295–306.

[84] L. E. Blowers and T. M. A. Wilson, The effect of urea on TMV: polarity of disassembly // *J. gen. Virol.*, — 1982, — v. 61, — №1, — pp. 137–141.

[85] R. Hogue and A. Asselin, Polyacrylamide-agarose gel electrophoresis of tobacco mosaic virus disassembly intermediates // *Can. J. Botany*, — 1984, — v. 62, — pp. 2236–2239.

[86] H. J. Vollenweider, J. M. Sogo, and T. Koller, // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, — 1975, — v. 72, — pp. 83.

[87] G. Lebeurier, A. Nicolaieff, and K. E. Richards, Inside-out model for self-assembly of tobacco mosaic virus (electron microscopy) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, — 1979, — v. 74, — №1, — pp. 149–153.

[88] L. S. Lerman, *The polymer- and salt-induced condensation of DNA*. Physico-chemical properties of the nucleic acids, — London: Academic Press, 1973.

[89] L. S. Lerman, A transition to a compact form DNA in polymer solution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, — 1971, — v. 68, — pp. 1886–1890.

[90] L. C. Gosule and J. A. Schellmann, Compact form of DNA induced by spermidine // *Nature*, — 1976, — v. 259, — pp. 333–335.

[91] D. K. Chattoraj, L. C. Gosule, and J. A. Schellmann, DNA condensation with polyamines. II. Electron microscopic studies // *J. Mol. Biol.*, — 1978, — v. 121, — pp. 327–337.

[92] R. Marquet, A. Wyart, and C. Houssier, Influence of DNA length on spermine-induced condensation. importance of the bending and stiffening of DNA // *Biochemica et Biophysica Acta*, — 1987, — v. 909, — pp. 165–172.

[93] Y. Y. Vengerov, L. P. Martinkina, and T. E. Semenov, Electron microscopic study of compaction of individual DNA molecules with histone Hl in surface films // *FEBS*, — 1993, — v. 322, — №3, — pp. 311–314.

[94] S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeyev, and K. Yoshikawa, Transition of double-stranded DNA chains between random coil and compact globule states induced by cooperative binding of cationic surfactant // *J. Am. Chem. Soc.*, — 1995, — v. 117, — pp. 9951–9956.

[95] S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeyev, and K. Yoshikawa, Discrete coil-globule transition of large DNA induced by cationic surfactant // *J. Am. Chem. Soc.*, — 1995, — v. 117, — pp. 2401–2408.

[96] R. W. Wilson and V. A. Bloomfield, Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid: a light-scattering study // *Biochemistry*, — 1979, — v. 18, — pp. 2192–2196.

[97] V. A. Bloomfield, Condensation of DNA by multivalent cations: Consideration on mechanism // *Biopolymers*, — 1991, — v. 31, — pp. 1471–1481.

[98] I. Baeza, P. Gariglio, L. M. Rangel, P. Chavez, L. Cervantes, C. Arguello, C. Wong, and C. Montanez, Electron microscopy and biochemical properties of polyamine-compacted DNA // *Biochemistry*, — 1987, — v. 26, — pp. 6387–6393.

[99] S. A. Allison, J. C. Herr, and J. M. Schurr, Structure of viral $\varphi 29$ DNA condensed by simple triamines: A light-scattering and electron-microscopy study // *Biopolymers*, — 1981, — v. 20, — pp. 469–488.

[100] Y. Fang and J. H. Hoh, Early intermediate in spermidine-induced DNA condensation on the surface of mica // *JACS*, — 1998, — v. 120, — №35, — pp. 8903–8909.

[101] D. D. Dunlap, A. Maggi, M. R. Soria, and L. Monaco, Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery // *Nucl. Acids. Res.*, — 1997, — v. 25, — pp. 3095.

[102] S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeyev, Y. S. Mel'nikova, and K. Yoshikawa, Folding of long DNA chains in the presensce of distearyldimethylammonium bromide and unfolding induced by neutral liposomes // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, — 1997, — v. 93, — №2, — pp. 283–288.

[103] J. Widom and R. L. Baldwin, Cation-induced toroidal condensation of DNA: studies with $Co^{3+}(NH_3)_6$ // *J. Mol. Biol.*, — 1980, — v. 144, — pp. 431–453.

[104] О. А. Пышкина, *Комплексы ДНК-ПАВ в малополярных органических растворителях*. Автореф. дис. . . . канд. хим. наук, МГУ, 1997. — 22 с.

[105] Е. Д. Щукин, А. В. Перцов, Е. А. Амелина, *Коллоидная химия*. — М.: Высшая школа, 1992. — 414 с.

[106] С. И. Васильев, Ю. Н. Моисеев, Н. И. Никитин, С. В. Савинов, И. В. Яминский, Сканирующий туннельный микроскоп «СКАН-8»: конструкция и области применения // *Электронная промышленность*, — 1991, — №3, — сс. 36–39.

[107] О. А. Пышкина, В. Г. Сергеев, А. Б. Зезин, В. А. Кабанов, Высокомолекулярную ДНК можно растворить в малополярных органических растворителях путем комплексования с катионными поверхностно-активны ми веществами // *Доклады РАН*, — 1996, — т. 348, — №4, — сс. 496–498.

[108] V. Y. Uvarov, Y. D. Ivanov, A. N. Romanov, M. O. Gallyamov, O. I. Kiselyova, and I. V. Yaminsky, Scanning tunneling microscopy study of cytochrome P-450 2B4 incorporated in proteoliposomes // *Biochimie*, — 1996, — v. 78, — pp. 780–784.

[109] K. Deguchi and J. Mino, Solution properties of long-chain dialkyldimethyl ammonium salts // *Journal of Colloid and Interface Science*, — 1978, — v. 65, — №1.

[110] V. G. Sergeyev, S. V. Mikhailenko, O. A. Pyshkina, I. V. Yaminsky, and K. Yoshikawa, How does alcohol dissolve the complexes of DNA with a surfactant // *JACS.*, — 1999. (in press).

[111] I. Langmuir, // *JACS*, — 1917, — v. 39, — pp. 1848.

[112] М. Джейкок, Д. Парфит, *Химия поверхностей раздела фаз*. — М.: Мир, 1984. — 269 с.

[113] K. B. Blodgett and I. Langmuir, // *Phys. Rev.*, — 1937, — v. 51, — pp. 964.

[114] K. Kobayashi, K. Taklaoka, and S. Ochiai, // *Thin Solid Films*, — 1988, — v. 159, — pp. 267.

[115] A. L. Rogach, L. Katsikas, and A. Kornowsky, // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, — 1996, — v. 100, — pp. 1772.

[116] Y. Fang and J. Yang, Role of the bilayer-bilayer interaction on the ripple structure of supported bilayers in solution // *J. Phys. Chem.*, — 1996, — v. 100, — №38, — pp. 15614–15619.

[117] W. A. Ducker and E. J. Wanless, Surface-aggregate shape transformation // *Langmuir*, — 1996, — v. 12, — №24, — pp. 5915–5920.

[118] S. Manne and H. E. Gaub, Molecular organization of surfactant at solid-liquid interfaces // *Science*, — 1995, — v. 270, — pp. 1480–1482.

[119] С. Е. Бреслер, *Введение в молекулярную биологию*. — М., Ленинград: Наука, 1966. — 512 с.

[120] Э. Зенгуил, *Физика поверхности*. — М.: Мир, 1990. — 536 с.

[121] И. Ф. Люксютов, А. Г. Наумовец, В. Л. Покровский, *Двумерные кристаллы*. — Киев: Наукова думка, 1988. — 218 с.

[122] А. И. Китайгородский, *Органическая кристаллохимия*. — М.: Изд-во АН СССР, 1955. — 558 с.

[123] А. И. Китайгородский, *Молекулярные кристаллы*. — М.: Наука, 1971. — 424 с.

[124] D. L. Dorset and B. K. Annis, Lamellar order and the crystallization of linear chain solid solution // *Macromolecules*, — 1996, — v. 29, — №8, — pp. 2969–2973.

[125] J. P. K. Peltonen, P. He, and J. B. Rosenholm, Order and defect of Langmuir-Blodgett films detected with the atomic force microscopy // *J. Am. Chem. Soc.*, — 1992, — v. 114, — pp. 7637–7642.

[126] M. Florsheimer, A. J. Steinfort, and P. Gunter, Lattice constant of Langmuir-Blodgett films measured by atomic force microscopy // *Surface Science Letters*, — 1993, — v. 297, — pp. L39–L42.

[127] D. K. Schwartz, R. Viswanathan, and J. A. N. Zasadzinski, Coexisting lattice structures in a Langmuir-Blodgett film identified by atomic-force microscopy // *Langmuir*, — 1993, — v. 9, — pp. 1384–1391.

[128] R. Viswanathan, J. A. Zasadzinski, and D. K. Schwartz, Spontaneous chiral symmetry breaking by achiral molecules in a Langmuir-Blodgett film // *Nature*, — 1994, — v. 368, — pp. 440–443.

[129] J. A. Zasadzinski, R. Viswanathan, L. Madsen, J. Garnaes, and D. K. Schwartz, Langmuir-Blodgett films // *Science*, — 1994, — v. 263, — pp. 1726–1732.

[130] J. A. Zasadzinski, R. Viswanathan, D. K. Schwartz, J. Garnaes, L. Madsen, S. Chiruvolu, J. T. Woodward, and M. L. Longo, Application of atomic force microscopy to structural characterization of organic thin films // *Colloids and surfaces*, — 1994, — v. A 93, — pp. 305.

[131] A. Schaper, L. Wolthaus, D. Mobius, and T. M. Jovin, Surface morphology and stability of Langmuir-Blodgett mono- and multilayers of saturated fatty acids by scanning force microscopy // *Langmuir*, — 1993, — v. 9, — №8, — pp. 2178–2184.

[132] T. Kajiyama, Y. Oishi, F. Hirose, K. Shuto, and T. Kuri, Direct observation of molecular arrangements in fatty acid monolayers with an atomic force microscope // *Langmuir*, — 1994, — v. 10, — №4, — pp. 1297–1299.

Приложение А

А.1. Программа, реализующая численное решение задачи о контактных деформациях зонда и цилиндрического образца

Ниже приведен текст программы, написанной на языке C++.

```
#include <math.h>
#include <stdlib.h>
#include <io.h>
#include <iostream.h>

double F,E1,E2,D,A,B,a,b,a0,b0,R1,R2,h,b_a_2,k,a_b,P,C;

double K_ell(double k_1)    //first elleptical integral
      {
       double K_count = 1.0, q_count = 1.0, m;
       m = (1.0 - k_1)/(1.0 + k_1);
       for (int i = 1; i < 1000; i += 2)
           {
            q_count = q_count*i*i/(i + 1)/(i + 1)*m*m;
            K_count = K_count + q_count;
           };
       return (M_PI/2.0*(1.0 + m)*K_count);
      }

double E_ell(double k_1)    //second elleptical integral
      {
       double E_count = 1.0, q_count = 1.0, m;
       m = (1.0 - k_1)/(1.0 + k_1);
       for (int i = 1; i < 1000; i += 2)
           {
            q_count = q_count*(i-2)*(i-2)/(i+1)/(i+1)*m*m;
            E_count = E_count + q_count;
           }
       return (M_PI/2.0/(1.0 + m)*E_count);
      }
```

```
main()
      {
       //Main parameters input
       cout << "F = ? (nN)" << endl;
       cin >> F;
       F = F*1.0e-9;
       cout << "E_sample = ? (GPa)" << endl;
       cin >> E1;
       E1 = E1*1.0e9;
       cout << "E_probe = ? (GPa)" << endl;
       cin >> E2;
       E2 = E2*1.0e9;
       D = 3.0/4.0*(1.0/E1 + 1.0/E2);
       cout << "R_sample (cil, nm) = ?" << endl;
       cin >> R1;
       R1 = R1*1.0e-9;
       cout << "R_probe (sph, nm) = ?" << endl;
       cin >> R2;
       R2 = R2*1.0e-9;

//     probe/sample
       A = 0.5*(1.0/R1 + 1.0/R2);
       B = 0.5/R2;

//     sample/substrate
//     A = 0.5/R1;
//     B = 0.5/(R2+2*R1);

       //Exact solution
       a = 0.1;
       b = 1.0;
       b_a_2 = b*b/a/a;
       for (int i = 1; i < 1000; i++)
          {
           a_b = sqrt(1.0/b_a_2);
           b_a_2 = A/B*K_ell(a_b)/E_ell(a_b);
           b_a_2 = b_a_2 - A/B + K_ell(a_b)/E_ell(a_b);
          };
       b = 2.0*F*D/M_PI/B/(1.0 - a_b*a_b);
       b = b*(K_ell(a_b) - E_ell(a_b));
       b = pow(b, 1.0/3.0);
       a = a_b*b;
       h = 2.0*F*D/M_PI/b*K_ell(a_b);
       P = F/M_PI/a/b;
       cout << " Test: exactly" << endl;
       a = a*1e9, b = b*1e9, h = h*1e9, P = P*1e-9;
       cout << " a = " << a << " nm";
       cout << " b = " << b << " nm" << endl;
       cout << " h = " << h << " nm" << endl;
       cout << " P = " << P << " MPa" << endl;

       //Approximating solutions

       // first: a sim b
       cout << " Test: a sim b" << endl;
       a = pow(2.0*F*D*(1.0/A + 1.0/B), 1.0/3.0);
```

```
        a = a/(1.0 + A/B);
        b = A*a/B;
        h = 2.0*F*D/(a + b);
        P = F/M_PI/a/b;
        a = a*1e9, b = b*1e9, h = h*1e9, P = P*1e-9;
        cout << " a = " << a << " nm";
        cout << " b = " << b << " nm" << endl;
        cout << " h = " << h << " nm" << endl;
        cout << " P = " << P << " MPa" << endl;


        //second: b>a
        cout << " Test: b > a " << endl;
        a = 0.1;
        b = 1.0;
        b_a_2 = b*b/a/a;
        for (int i=1; i < 1000; i++)
           {
            C = log(4.0*sqrt(b_a_2)) - 1.0;
            b_a_2 = A/B*C;
           };
        b = pow (2.0*C*F*D/M_PI/B, 1.0/3.0);
        a = pow (4.0*B*F*F*D*D/M_PI/M_PI/C/A/A/A, 1.0/6.0);
        P = F/M_PI/a/b;
        h = 2*F*D*(C + 1.0)/M_PI/b;
        a = a*1e9, b = b*1e9, h = h*1e9, P = P*1e-9;
        cout << " a = " << a << " nm";
        cout << " b = " << b << " nm" << endl;
        cout << " h = " << h << " nm" << endl;
        cout << " P = " << P << " MPa" << endl;
}
```

Программа представляется достаточно простой: в качестве функций `K_ell` и `E_ell` реализованы процедуры вычисления полных эллиптических интегралов по асимпотикам, приведенным в [69]. Основная часть начинается с запроса параметров задачи, затем определяются параметры A и B (по формуле (2.12), если интересна область контакта образца и подложки, то следует использовать формулу (2.23)), после чего реализовано точное решение (по формулам (2.10), (2.11), (2.9). Для приближенного решения реализованы два случая: $a \sim b$ (с использованием формул (2.21), (2.22) и $a < b$[1] по формулам (2.17), (2.18). В качестве результата работы программа выдает найденные значения параметров области контакта (a и b), величину деформации h и контактное давление P.

[1] для определенности

A.2. Программа, реализующая численное решение задачи восстановления реальной геометрии объекта по измеренному АСМ-профилю

Ниже приведен текст программы, написанной на языке C++.

```
#include <conio.h>
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <fstream.h>
#include <stdlib.h>
#include <io.h>
#include <iostream.h>

double d_vtm, k, a, b, R, d, x, x1, x2;
int i, N, N1, N2, N_sph_bad, N_par_bad;

double sq(double z)
      {
       return (sqrt(fabs(R*R-(z-d)*(z-d))));
      }
double func_sph(double z)
      {
       double temp = (b*b-(R-sq(z))*(R-sq(z)))*sq(z);
       return (temp+z*(z-d)*(R-sq(z)));
      }
double func_par(double z)
      {
       return (k*k*(z-d)*(z-d)*(z-d)*(z+d)+b*b);
      }
double a_sph()
      {
       if (d > R) x1 = d-R;
       else
           {
            if (b > R-sqrt(R*R-d*d)) return 0.0;
            else x1 = 1e-6;
           };
       x2 = d;
       for (int i = 1; i < N; i++)
          {
           x = (x1+x2)/2.0;
           if (func_sph(x1)*func_sph(x) > 0.0) x1=x;
           else x2=x;
          };
       if ((R-sq(x))*(R-sq(x))/b/b < 1.0)
         {
          return (x/sqrt(1.0-(R-sq(x))*(R-sq(x))/b/b));
         }
       else return 0.0; // flag: no solution
      };
double a_par()
```

```
      {
       x1 = 1e-6;
       x2 = d;
       if (b > d*d*k) return 0.0;
       else
           {
            for (int i = 1; i < N; i++)
               {
                x = (x1+x2)/2.0;
                if (func_par(x1)*func_par(x)>0.0) x1 = x;
                else x2 = x;
               };
           };
       return sqrt (0.5*x*(x+d));
      }
main()
    {
     ofstream outFile;
     ifstream inFile;
     outFile.open("RESULT.DAT");
     inFile.open ("DATA.DAT");
     cout <<" data file lenght?" << endl;
     cin >> N1;
     cout << " testing phase?" << endl;
     cout << "        1 - yes" << endl;
     cout << "        0 - no" << endl;
     cin >> N2;
     if (N2 == 1)
       {
        cout << " VTM width at half-height?" << endl;
        cin >> d_vtm;
        d_vtm = d_vtm/2.0;
        R = (d_vtm*d_vtm-81.0)/18.0;
        x = 0.5*(sqrt (d_vtm*d_vtm+648.0)-d_vtm);
        k = sqrt (81.0-x*x)/(x-d_vtm)/(x-d_vtm);
        cout << " for sphere, R=" << R << endl;
        cout << " for parabola, k=" << k << endl;
        cout << " Press any key..." << endl;
        N2 = getch();
       }
     else
         {
          cout << " R (sphere)?" << endl;
          cin >> R;
          cout << " k (parabola)?" << endl;
          cin >> k;
         };
     N = 1000;
     cout << " sphere        parabola" << endl;
     for (int j = 1; j < N1; j++)
        {
         inFile >> d;
         d = d/2.0;
         inFile >> b;
         b = b/2.0;
         a = a_sph();
```

```
        if (a != 0.0)
          {
           outFile << a << " ";
           cout <<" a = "<<a << " ";
          }
        else
            {
             N_sph_bad++;
             cout << " no" << " ";
             outFile << "-" << " ";
            };
        a = a_par();
        if (a != 0.0)
          {
           outFile << a << endl;
           cout << " a = " << a << endl;
          }
        else
            {
             N_par_bad++;
             cout << " no" << endl;
             outFile << "-" << endl;
            };
      };
  cout <<" Sphere wrong:" << N_sph_bad << endl;
  cout <<" Parabola wrong:" << N_par_bad << endl;
 };
```

Программа реализована по следующей схеме. Как показал анализ, погрешность определяемых значений существенно зависить от погрешности входных параметров (особенно измеренной ширины профиля на полувысоте d). Для уменьшения этой погрешности необходим набор достаточной статистики для значений входных параметров — h (высоты) и d. Поэтому в программе ввод входных данных осуществляется в виде файла (`"data.dat"`) состоящего из двух столбцов значений для h и для d соответственно. На этапе вычисления программа запрашивает о величине набранной статистики (количестве строк в файле `"data.dat"`). Вывод значений также осуществляется в файл (`result.dat`)[2], в две колонки (для аппроксимации иглы сферой и параболой соответственно).

Функции `func_sph` и `func_par` построены по формулам (2.34, 2.36), далее, функции `a_sph` и `a_par` реализуют решение уравнений (2.34, 2.36) относительно x_0 и, по найденному x_0, вычисление искомого значения a по формулам (2.35, 2.37). Одновременно, эти функции осуществляют проверку выполнения условий (2.38, 2.39) отсутствия решений; подсчет числа случаев отсутствия решений ведут счетчики `N_sph_bad` и

[2] с тем же количеством строк, что и `"data.dat"`

`N_par_bad` для сферической и параболической аппроксимаций соответственно.

Работа программы по желанию может быть предварена тестирующей фазой, в которой по измеренным параметрам АСМ-профиля тест-объекта (вируса табачной мозаики) определяются аппроксимирующие параметры иглы (R и k)[3].

А.3. Параметры промышленных кантилеверов

Основные параметры зондов промышленных кантилеверов (Nanoprobe, Digital Instruments, США) для атомно-силовых микроскопов приведены в таблице А.1. Эти кантилеверы использовались в настоящей работе.

[3] минуя тестирующую фазу эти параметры можно задать вручную

Модель	**NP-S**	**FESP(W)**	**TESP(W)**
	Oxide Sharpened Silicon Nitride	*Force Modulation Etched Silicon*	*Tapping Mode Etched Silicon*
Жесткость	0,06 Н/м, 0,12 Н/м, 0,38 Н/м, 0,58 Н/м	1–5 Н/м	20–100 Н/м
Резонансная частота	5–50 КГц	60–100 КГц	200–400 КГц
Радиус кривизны кончика иглы	5–40 нм	5–10 нм	5–10 нм
Высота иглы	3 мкм	10–15 мкм	10–15 мкм
Угол раствора конуса иглы	35°	$18°\vee 25°\vee 10°$	$18°\vee 25°\vee 10°$
Отражающее покрытие	Золото	нет	нет
Длина кантилевера	120 мкм, 200 мкм	225 мкм	125 мкм
Ширина кантилевера	15 мкм, 40 мкм	30 мкм	30–40 мкм
Толщина кантилевера	0,4–0,6 мкм	2–3 мкм	3,5–5 мкм
Форма кантилевера	V-образная	прямая	прямая

Таблица А.1. Параметры основных типов промышленных кантилеверов (Nanoprobe, Digital Instruments, США)