

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

**Л. В. КУХАРЕНКО**

# **СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

Учебно-методическое пособие



Минск 2007

УДК 57.081.23 (075.8)  
ББК 22.338 я 73  
К 95

Утверждено Научно-методическим советом университета в качестве  
учебно-методического пособия 30.05.2007 г., протокол № 9

Р е ц е н з е н т ы: проф. Б. А. Слука; доц. Г. К. Ильич

**Кухаренко, Л. В.**

К 95 Сканирующая зондовая микроскопия для анализа медико-биологических объектов :  
учеб.-метод. пособие / Л. В. Кухаренко. – Минск : БГМУ, 2007. – 12 с.

ISBN 978–985–462–719–9.

Сравниваются методы исследования морфологии медико-биологических объектов. Рассматриваются принцип и режимы работы атомно-силового микроскопа (АСМ) как представителя семейства сканирующих зондовых микроскопов.

Предназначено для студентов всех факультетов, аспирантов и соискателей.

УДК 57.081.23 (075.8)  
ББК 22.338 я 73

---

Учебное издание

**Кухаренко Людмила Валентиновна**

**СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ  
ДЛЯ АНАЛИЗА  
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Л. В. Кухаренко

Редактор О. В. Иванова

Корректор Ю. В. Киселёва

Компьютерная вёрстка Н. В. Тишевич

Подписано в печать 31.05.07. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 0,7. Уч.-изд. л. 0,57. Тираж 100 экз. Заказ 528.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусский государственный медицинский университет.

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, Ленинградская, 6.

ISBN 978–985–462–719–9

© Оформление. Белорусский государственный  
медицинский университет, 2007

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Размеры и форма некоторых биологических структур во многом определяют их физиологические свойства. Поэтому исследование морфологических параметров биологических структур является важным этапом для успешного решения проблем, связанных с генетическими болезнями, вирусными инфекциями, механизмами лекарственных воздействий.

Оптическая микроскопия способствовала возникновению и развитию новых наук — гистологии, патологической анатомии, микробиологии. Но у оптического микроскопа есть свой предел разрешения, который ограничивает его возможности. Пределом разрешения микроскопа называют такое наименьшее расстояние между двумя точками предмета, которые воспринимаются в микроскопе раздельно. Более 100 лет назад немецкий физик Эрнст Аббе указал на фундаментальные ограничения, непреодолимые для любого оптического микроскопа — из-за дифракции света не возможно рассмотреть объекты, размеры которых меньше, чем половина длины волны падающего излучения. Поэтому предел разрешения для оптических микроскопов составляет около 0,2 мкм, а самыми маленькими объектами, которые еще можно различать в оптическом микроскопе, являются бактерии и митохондрии. Трудности изучения клеток с помощью оптической микроскопии связаны с тем, что они бесцветны и прозрачны, поэтому основные клеточные структуры были открыты только после введения в практику красителей. Именно красители обеспечили достаточный контраст изображения. Чаще всего для оптической микроскопии клетки обрабатывают фиксирующим агентом, чтобы иммобилизовать и сохранить их. После фиксации ткани обычно нарезают микротомом на очень тонкие срезы (толщиной от 1 до 10 мкм), которые затем помещают на предметное стекло. При таком способе подготовки возможно повреждение структуры клеток или макромолекул, поэтому предпочтительным методом является быстрое замораживание. Замороженную ткань режут микротомом, установленным в холодной камере. После приготовления срезов клетки окрашивают. Для этой цели используют органические красители: малахитовую зелень, судан черный и т. д. Каждый из них характеризуется определенным сродством к клеточным компонентам, например, гематоксилин обладает сродством к отрицательно заряженным молекулам, поэтому позволяет выявить в клетках ДНК.

Мир более миниатюрных биологических объектов — вирусов, отдельных молекул белка, ДНК, лежит за пределами досягаемости традиционной для медико-биологических объектов оптической микроскопии. До недавнего времени его можно было изучать только с помощью трудоемких, подчас разрушающих исследуемый объект методов, таких как электронная микроскопия. Для биологических объектов предел разрешения электронного микроскопа, работающего только в вакууме, составляет 2 нм (примерно в 100 раз меньше, чем у оптического микроскопа). Одним из самых больших недостатков электронной микроскопии является то, что биологические образцы необходимо подвергнуть специальной и сложной обработке. Во-первых, их фиксируют сначала глутаровым альдегидом, а затем ос-

миевой кислотой, связывающей и стабилизирующей двойной слой липидов и белков. Во-вторых, электроны обладают низкой проникающей способностью, поэтому приходится делать сверхтонкие срезы, а для этого образцы обезвоживают и пропитывают смолами. В-третьих, для усиления контраста образцы обрабатывают солями тяжелых металлов, такими как осмий, уран и свинец.

В сканирующем электронном микроскопе для получения изображения используются электроны, рассеиваемые или излучаемые поверхностью образца. Образец в данном случае фиксируют, высушивают и покрывают тонкой пленкой тяжелого металла, а затем сканируют узким пучком электронов. Предел разрешения этого метода составляет около 10 нм. Сканирующий электронный микроскоп не применим для изучения внутриклеточных органелл. Как оптическая, так и электронная микроскопия не позволяют непосредственно получать информацию о высоте исследуемых биообъектов.

Исследования биологических объектов с помощью оптической и электронной микроскопий дают картину морфологии клеток, зафиксированных, окрашенных или покрытых тонким слоем металла, полученным путем напыления образца. Исследовать изменение морфологии клеток при их взаимодействии с вирусами или лекарствами в условиях максимально приближенных к нативным не было возможным, но представлялось весьма заманчивым. Такие возможности в исследовании клеток, бактерий, вирусов, ДНК открывает принципиально новый метод исследования поверхностной морфологии — сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ). СЗМ позволяет исследовать биологические объекты без специальных фиксаторов и красителей, на воздухе или даже в жидкой среде.

В сканирующем зондовом микроскопе вместо оптического излучения или электронного луча используется зонд-игла, перемещающийся вдоль поверхности образца, как бы построчно «считывая» его рельеф. Термин СЗМ относится к любым типам микроскопов, в которых изображение формируется за счет перемещения острого микрозонда над исследуемой поверхностью.

Основное отличие разных методов зондовой микроскопии состоит в типе применяемого зонда и физическом эффекте, лежащем в основе работы микроскопа. Из всего семейства СЗМ можно упомянуть сканирующий туннельный микроскоп (СТМ), атомно-силовой микроскоп (АСМ), сканирующий ближнепольный оптический микроскоп (СБОМ). Для изучения структуры (особенностей строения и функционирования) медико-биологических объектов на клеточном и молекулярном уровнях в основном используется атомно-силовая микроскопия.

# АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

## Принципы устройства АСМ

Атомно-силовой микроскоп состоит из следующих основных принципиальных элементов (рис. 1): кантилевера, пьезоэлектрического манипулятора и закрепленного на нем образца, оптической системы, состоящей из лазера и четырехсекционного фотодиода, цепи обратной связи и компьютера.

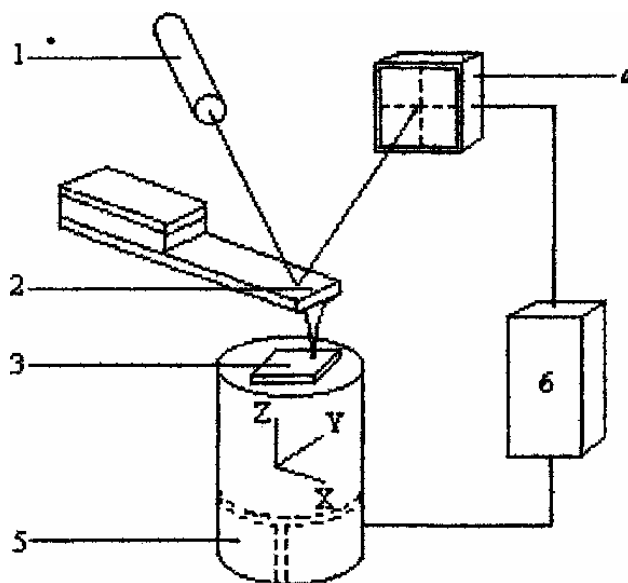


Рис. 1. Схема атомно-силового микроскопа:

1 — лазер; 2 — кантилевер; 3 — образец; 4 — четырехсекционный фотодиод; 5 — пьезоманипулятор; 6 — блок обратной связи

Принцип работы АСМ основан на построчном перемещении (сканировании) острой иглы относительно поверхности образца. Причем в реальных условиях кантилевер закреплен, а перемещается образец. Размер области сканирования можно задавать.

Одним из главных элементов АСМ является кантилевер, который представляет собой микронзонд в виде упругой планки (консоли), на свободном конце которой закреплена острая игла.

Для изготовления кантилеверов используется кремний, оксид кремния и нитрид кремния. Длина консоли лежит в пределах 50–200 мкм, ширина значительно меньше — от 5 до 50 мкм. Обычно кантилевер имеет прямоугольную форму, но часто для снижения влияния боковых сил ему придают V-образную (треугольную) форму (рис. 2).

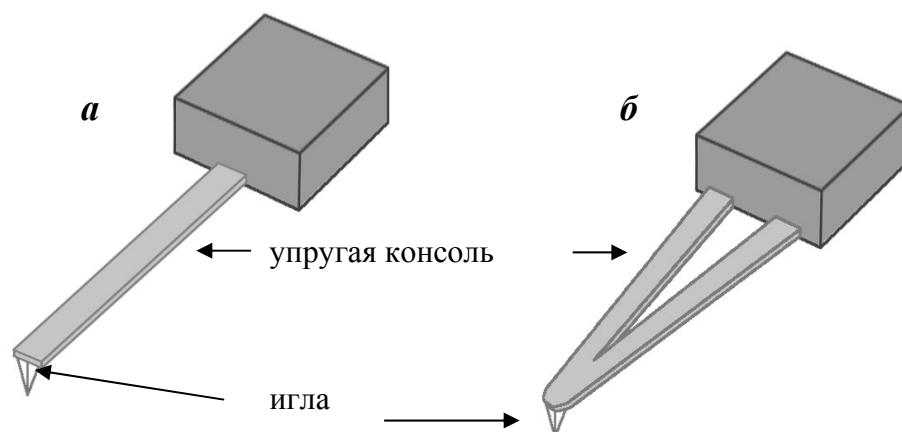


Рис. 2. Общий вид зонда АСМ:

*а* — с прямоугольным; *б* — треугольным кантилевером

Высота иглы на кончике консоли кантилевера не превышает нескольких микрометров. Радиус закругления кончика иглы составляет от 1 до 50 нм (рис. 3).

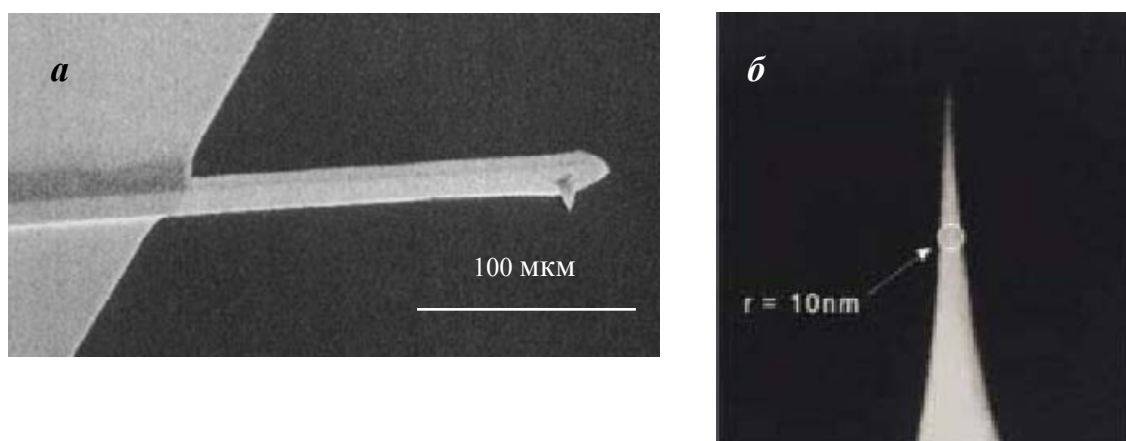


Рис. 3. Изображения, полученные с помощью электронной микроскопии:

*а* — кантилевер; *б* — игла

Обычно исследуемый образец крепится с помощью магнитного держателя к пьезоманипулятору, который представляет собой пьезокерамическую трубку (рис. 1). Действие таких пьезоманипуляторов основано на свойстве пьезокерамики изменять свои геометрические размеры под влиянием электрического напряжения (так называемый обратный пьезоэффект). Подаваемое напряжение на X- или Y-электроды пьезотрубки вызывает ее изгиб в горизонтальной плоскости, а изменение напряжения на Z-электродах вызывает удлинение или сжатие пьезотрубки в вертикальной плоскости. В результате осуществляется заданное контролируемое механическое перемещение образца по всем трем координатным осям с точностью до сотых долей нанометра.

При приближении острия к исследуемому образцу между ними возникают различные силы межатомного взаимодействия (притяжения или отталкивания), что приводит к небольшому упругому изгибу кантилевера. Величину этого изгиба, а следовательно, и величину силы взаимодействия, можно регистри-

ровать в процессе сканирования. Это осуществляют с помощью оптической системы, состоящей из лазера, луч которого направлен на кончик кантилевера, и четырехсекционного фотодиода, регистрирующего отраженный от кантилевера свет. В положении равновесия кантилевера отраженный от него луч лазера падает в центр четырехсекционного фотодиода (рис. 4а). При приближении кантилевера к поверхности образца между иглой и исследуемой поверхностью начинает действовать сила притяжения (рис. 4б). При дальнейшем приближении кантилевера к поверхности образца, когда расстояние между иглой и исследуемой поверхностью будет составлять доли нанометра, начинает действовать сила отталкивания (рис. 4в). Силовое взаимодействие иглы с поверхностью приводит к упругому изгибу кантилевера от положения равновесия. При изгибе кантилевера отраженный от него луч лазера смещается относительно центра четырехсекционного фотодиода, и по относительному изменению освещенности секторов фотодиода определяется величина изгиба кантилевера.

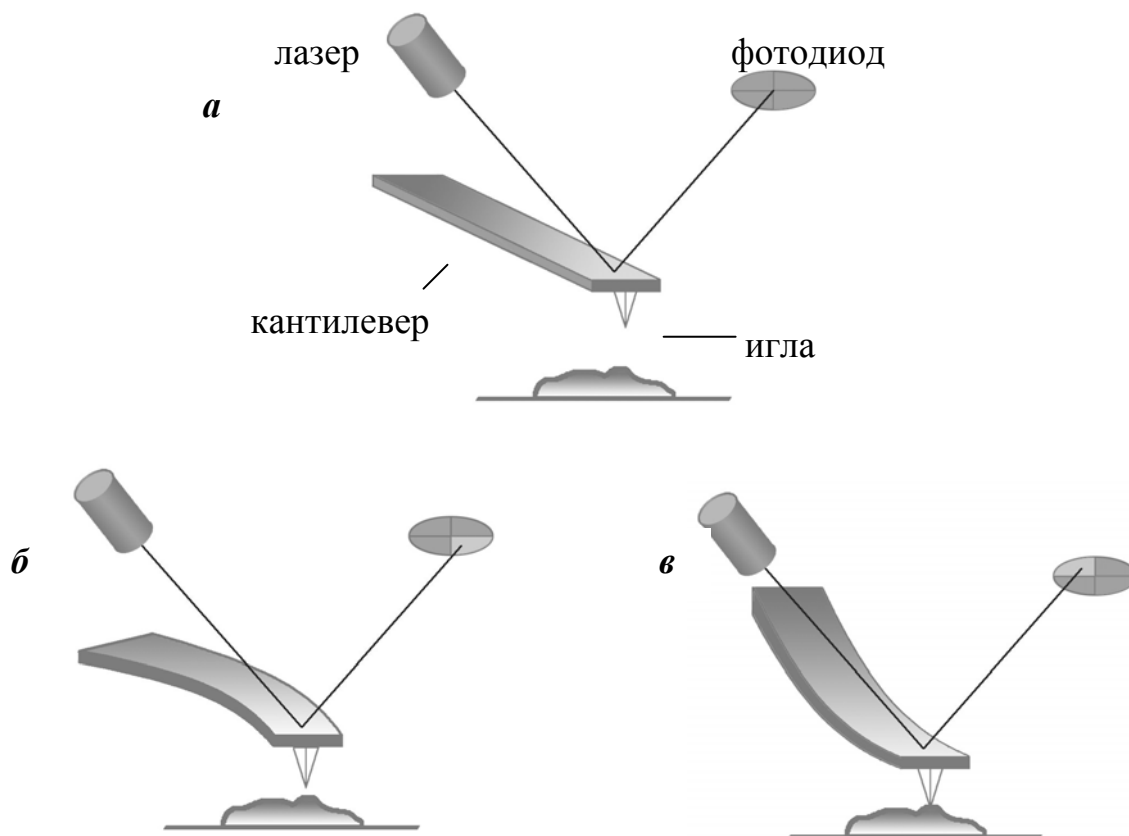


Рис. 4. Оптическая схема регистрации отклонений кантилевера:  
 а — положение равновесия; б — действие силы притяжения; в — действие силы отталкивания

Величину изгиба кантилевера, а следовательно, и силу взаимодействия между иглой и образцом, поддерживают постоянной с помощью цепи обратной связи. Во время сканирования сигнал с фотодиода подается на цепь обратной связи. При уменьшении изгиба кантилевера, т. е. при уменьшении силы отталкивания между иглой и образцом, пьезотрубка, на которой располагается образец, растягивается по оси Z, приближая образец к игле. При увеличении изгиба кантилевера пьезотрубка, наоборот, сжимается, чтобы отдалить образец от иглы.

Электрическая информация от пьезоманипулятора и фотодиода в цифровом виде поступает в управляющий компьютер, который на основе этих данных строит трехмерные или двумерные изображения рельефа исследуемой поверхности.

Принцип работы АСМ состоит в следующем: при приближении иглы к исследуемому образцу между ними возникают силы взаимодействия, что приводит к упругому изгибу кантилевера. Величину этого изгиба регистрирует оптическая система. В процессе сканирования образец движется под иглой. Это движение осуществляется при помощи пьезоманипулятора, изменение размеров которого приводит к перемещению образца в трех направлениях. При движении образца под иглой система обратной связи поддерживает величину изгиба кантилевера, а значит и силу взаимодействия между иглой и исследуемой поверхностью, постоянной. Для поддержания постоянным изгиба кантилевера в зависимости от того, выступ или впадина встречаются на пути иглы, образец отводится или приближается к зонду-игле. Таким образом, игла описывает профиль исследуемой поверхности.

### СИЛЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИГЛЫ И ОБРАЗЦА

В основе работы АСМ лежит регистрация сил взаимодействия, возникающих между иглой и образцом.

В общем виде зависимость силы межатомного взаимодействия  $F$  от расстояния между атомами  $r$  имеет вид:

$$F(r) = -\frac{a}{r^m} + \frac{b}{r^n}.$$

Константы  $a$  и  $b$  и показатели степени  $m$  и  $n$  зависят от сорта атомов и типа химических связей. Качественно зависимость  $F(r)$  показана на рис. 5.

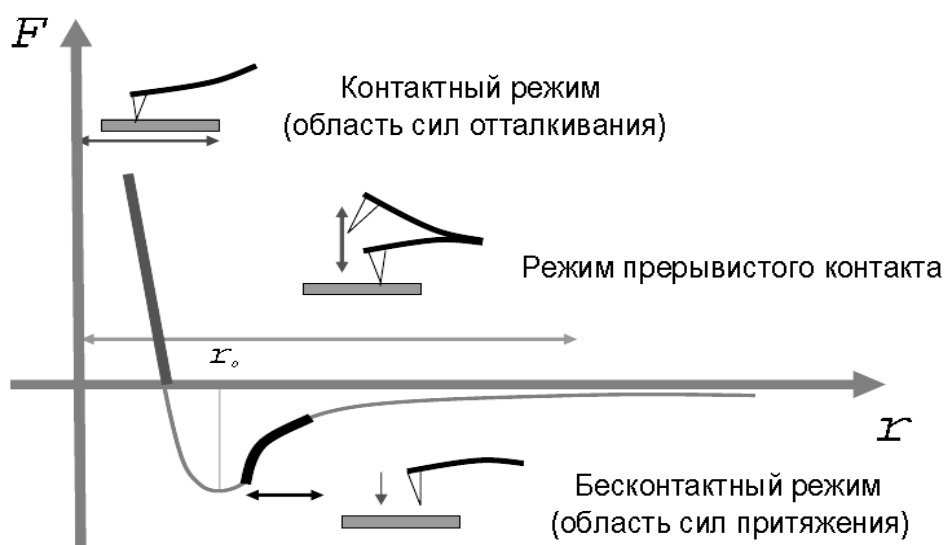




Рис. 5. Зависимость силы взаимодействия  $F$  от расстояния  $r$  между атомами иглы и исследуемой поверхности

Силы межатомного взаимодействия имеют электромагнитную природу. Силы отталкивания принято считать положительными, силы притяжения — отрицательными. Силы притяжения и отталкивания быстро убывают с увеличением расстояния  $r$  между атомами иглы и исследуемой поверхностью. Это короткодействующие силы. При приближении иглы к поверхности образца при  $r > r_0$  на нее начинает действовать сила притяжения. На расстоянии  $r_0$  между атомами иглы и поверхности образца силы притяжения и отталкивания уравновешивают друг друга. Это равновесное расстояние составляет примерно 0,3 нм. При дальнейшем приближении кантилевера (в области касания иглы с поверхностью образца при  $r < r_0$ ) электронные оболочки атомов на конце иглы и атомов поверхности образца начинают перекрываться, что приводит к появлению силы отталкивания.

## РЕЖИМЫ РАБОТЫ АСМ

В зависимости от типа и степени взаимодействия режимы работы АСМ можно разделить на контактный, бесконтактный и режим прерывистого контакта, который является промежуточным между контактным и бесконтактным.

В **контактном режиме** острие иглы непосредственно контактирует с поверхностью образца в процессе сканирования (рис. 6). В этом режиме изгиб кантилевера вызван взаимным отталкиванием атомов кончика иглы и исследуемой поверхности из-за перекрывания их электронных оболочек. Измеряемые силы колеблются в пределах от  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$  Н. Величина изгиба прямо пропорциональна силе взаимодействия. Цепь обратной связи поддерживает величину изгиба кантилевера, а следовательно, и силу взаимодействия, постоянной в процессе сканирования, что и позволяет зонду описывать профиль исследуемой поверхности.

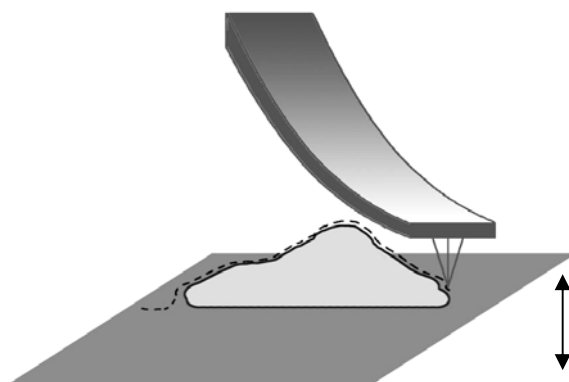


Рис. 6. Иллюстрация контактного режима работы АСМ

При работе АСМ в режиме **прерывистого контакта** кантилевер совершает колебания с резонансной частотой, и лишь в нижней точке своей траектории игла находится в контакте с образцом (рис. 7).

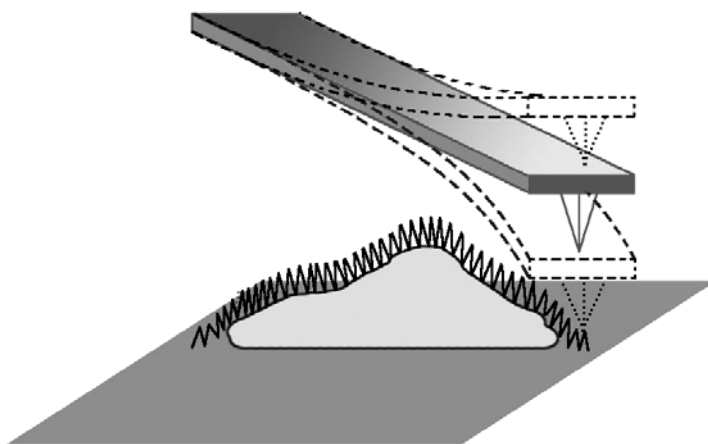


Рис. 7. Иллюстрация режима прерывистого контакта работы АСМ

Этот режим работы значительно уменьшает силовое воздействие зонда на исследуемую поверхность, что особенно важно при работе с мягкими медико-биологическими объектами, которые в контактном режиме могут быть повреждены иглой. При сближении зонда и образца изменяются параметры колебания (амплитуда  $A$  и фаза  $\varphi$ ), что дает возможность получать информацию об исследуемой поверхности. Режим прерывистого контакта характеризуется более высоким разрешением в плоскости сканирования по сравнению с контактном режимом. Это объясняется тем, что на иглу при ее движении не действуют боковые силы трения, вызывающие дополнительный изгиб кантилевера. Кроме того, при кратковременном контакте менее вероятно повреждение иглы или перенос на ее кончик загрязнений с поверхности.

**Бесконтактный режим** работы АСМ осуществляется, когда кончик иглы располагается на расстоянии 5–100 нм от исследуемой поверхности, и регистрируются слабые силы межмолекулярного притяжения, которые являются более дальнедействующими. Сила взаимодействия в этих случаях составляет  $10^{-8}$ – $10^{-14}$  Н.

В настоящее время атомно-силовая микроскопия широко используется в исследованиях медико-биологических объектов. Ее основными преимуществами по сравнению с электронной и оптической методиками являются:

- высокое пространственное разрешение (предел разрешения составляет  $10^{-10}$ – $10^{-11}$  м в плоскости сканирования) и наглядность представляемой информации: результатом исследований являются трехмерные изображения поверхности исследуемых биообъектов, отображаемые на экране монитора компьютера;

- возможность изучения реального рельефа поверхности биообъектов без применения таких сложных методов подготовки образцов, как напыление металлами, контрастирование солями тяжелых металлов, приготовление реплик и т. д., и без разрушения образцов под воздействием высокоэнергетического облучения;

- возможность проведения исследований медико-биологических объектов как на воздухе, так и в различных жидких средах для изучения функционирования отдельных клеток, а также процессов взаимодействия клеток с вирусами или лекарствами в состоянии, близком к нативному;
- возможность одновременного исследования локальных характеристик поверхности биообъектов, таких как жесткость, пластичность, адгезивность;
- возможность осуществлять манипулирование с наноразмерными объектами, производить направленное изменение химической структуры и валентного состояния отдельных молекул;
- изучение пространственного распределения магнитных и электрических силовых полей вблизи поверхности микрообъектов.

В таблице приведены сравнительные характеристики различных методов микроскопического исследования поверхности биообъектов. Из таблицы следует, что именно СЗМ дает наибольшее увеличение при работе с медико-биологическими объектами ( $10^9$  раз) по сравнению с оптической ( $10^3$  раз) и сканирующей электронной ( $10^6$  раз) микроскопиями. Основным преимуществом СЗМ по сравнению с электронной микроскопией является использование различных жидких сред для получения изображений живых клеток, а также неразрушающий характер воздействия во время сканирования мягких медико-биологических объектов. Кроме того, СЗМ дает информацию о высоте исследуемого биообъекта.

*Таблица*

**Сравнительная характеристика различных методов микроскопического исследования поверхности биообъектов**

Название метода	Увеличение, кратность	Рабочая среда	Размерность изображения	Воздействие на образец
Оптическая микроскопия	$10^3$	Воздух, жидкость	Двумерное	Неразрушающий метод
Сканирующий электронный микроскоп	$10^6$	Вакуум	Двумерное	Разрушающий метод
Сканирующий зондовый микроскоп	$10^9$	Вакуум, воздух, жидкость	Трехмерное	Неразрушающий метод

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие существуют методы исследования медико-биологических объектов?
2. Что такое сканирующая зондовая микроскопия? Какой принцип лежит в ее основе?
3. Назовите основные компоненты АСМ и их назначение.
4. Каковы основные отличия режимов работы АСМ?
5. Каковы основные преимущества АСМ по сравнению с электронной и оптической микроскопиями?

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии* / под ред. Н. С. Егорова. М., 1995.
2. *Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров* / под ред. И. В. Яминского. М., 1997.
3. *Миронов, В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии* / В. Л. Миронов. Н. Новгород, 2004.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Методы исследования морфологии медико-биологических объектов.....	3
Атомно-силовая микроскопия .....	4
Принципы устройства АСМ.....	4
Силы взаимодействия иглы и образца .....	8
Режимы работы АСМ .....	9
Контрольные вопросы.....	11
Литература .....	11