

АТОМНО-СИЛОВЫЕ МИКРОСКОПЫ КОМПАНИИ BRUKER: ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ В ИФХЭ РАН

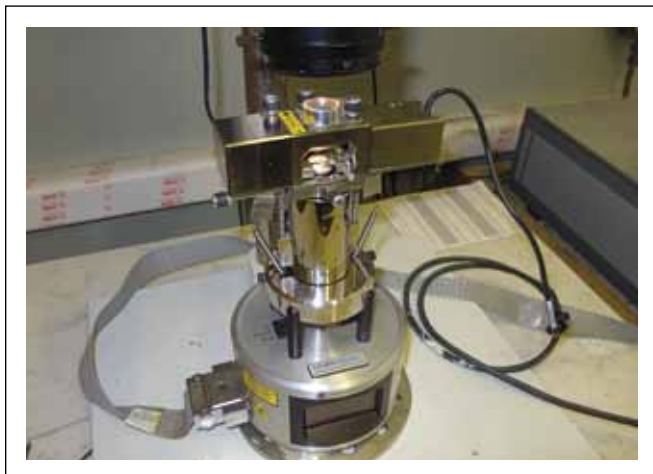
До 2010 года абсолютным мировым лидером в области атомно-силовых микроскопов выступала компания Veeco. В 2010 году она продала свой метрологический бизнес корпорации Bruker. В результате было сформировано подразделение Bruker Nano Surface Division (Bruker Nano), в которое вошло и направление атомно-силовой микроскопии. Год назад мы беседовали с президентом Bruker Nano Марком Мунком, который до слияния возглавлял отделение метрологии и инструментов компании Veeco. Тогда М.Мунк подробно рассказал о последних моделях атомно-силовых микроскопов Bruker, их новых опциях и уникальных возможностях. Однако это был взгляд со стороны производителя оборудования. Насколько эти приборы хороши в условиях реальной эксплуатации? Какие уникальные возможности они открывают перед исследователями? Какие практические задачи позволяют решать? Чтобы получить ответы на эти вопросы, мы обратились в Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина РАН (ИФХЭ РАН), в лабораторию электронных и фотонных процессов в полимерных наноматериалах. В секторе методов исследования наноразмерных систем этой лаборатории уже много лет эксплуатируются атомно-силовые микроскопы. Они используются в интересах всего ИФХЭ РАН, поэтому там накоплен большой опыт, получены практические результаты, причем в различных направлениях. Все это в достаточно полной мере позволяет оценить возможности и достоинства приборов.

Об оснащении лаборатории нам рассказал заведующий сектором методов исследования наноразмерных систем **Виктор Иосифович Золотаревский**.

Лаборатория оснащена двумя зондовыми микроскопами, которые могут работать как в режиме атомно-силового микроскопа (АСМ) так и в режиме туннельного микроскопа (СТМ). Первый из них, MultiMode IV (после модернизации – MultiMode V) компании Veeco (теперь – Bruker) с контроллером NanoScope IV, приобретен семь лет назад. Этот прибор комплектуется дополнительными модулями и может работать во многих режимах. В частности, с помощью специ-



* М.Мунк. Мир так быстро меняется. – Наноиндустрия, 2012, №6, с.8–18.



ACM MultiMode V

ального блока позволяет измерять распределение проводимости по поверхности, распределение поверхностных потенциалов. Есть модуль для работы в широком диапазоне температур – от -35° до 250°C . Сейчас активно используется модуль для электрохимических исследований. С его помощью, например, можно изучать скорость осаждения полианилиновых пленок на ранних стадиях, рассматривать структуры частиц в самом начале их осаждения в жидкости. Прибор позволяет работать в разных средах, в том числе – в инертной атмосфере. Есть специальная ячейка для работы в жидкости.

Сканирование образца длится несколько минут, что дает возможность снимать кинетику медленно протекающих процессов – например, в электрохимии. Прибор предназначен для работы с небольшими образцами: до 5 мм по высоте и до 15 мм в диаметре, что, конечно, накладывает



Контроллер NanoScope V



ACM EnviroScope

некоторые ограничения. Но для большинства задач этого достаточно.

Когда мы выбирали зондовый микроскоп, исходили из того, что MultiMode – это самая многофункциональная модель. На тот момент уже было установлено много таких приборов, опубликовано большое количество результатов исследований. MultiMode обладал наиболее широким спектром возможностей из представленных на рынке микроскопов. Поскольку наша лаборатория обеспечивает деятельность всего института для самых различных исследований, определяющим фактором в выборе именно этой модели для нас была универсальность. Не менее важной оказалась и простота управления – в настройке и работе прибор очень удобен. На зондовом микроскопе MultiMode у нас работают даже студенты, конечно, после определенной подготовки.

Второй зондовый микроскоп в нашей лаборатории – EnviroScope, также компании Bruker, он установлен в 2009 году. Принципиальная особенность этого прибора – возможность работать в вакууме, до 10^{-5} Торр. Мы использовали его, в частности, для исследования структуры монокристаллов наноалмазов, решетки оксида алюминия, J-агрегатов фталоцианинатов, графеновых структур и др. Работой EnviroScope управляет контроллер NanoScope V. Он поддерживает все новые уникальные режимы зондовых микроскопов Bruker – PeakForce Tapping (полуконтактный режим с регистрацией силы в каждой точке взаимодействия зонд-образец), PeakForce QNM (картирование наномеханических свойств поверхности), ScanAsyst (режим с автоматической настройкой параметров сканирования) и др. Контроллер универсален и подходит для большинства зондовых микроскопов Bruker. При

необходимости его можно использовать и с нашим MultiMode V.

Сейчас с атомно-силовыми микроскопами наиболее активно работают две группы – специалисты лаборатории электронных и фотонных процессов в полимерных наноматериалах и биологи из лаборатории биоэлектрохимии. Причем в последнее время существенно вырос объем именно материаловедческих работ.

Об исследованиях в области материаловедения, где активно используются АСМ, нам рассказал заведующий лабораторией электронных и фотонных процессов в полимерных наноматериалах **Анатолий Вениаминович Ванников**.

Как видно из названия, наша лаборатория занимается исследованиями строения полимерных наноматериалов. Мы изучаем в основном органические системы четырех видов. Во-первых, это электрохромные материалы, т.е. материалы, которые изменяют окраску под воздействием электрического поля. Во-вторых, структуры органических светодиодов – очень востребованное и развивающееся во всем мире направление. Третье направление – фотоэлектрические преобразователи, элементы солнечных батарей на основе полимерных полупроводниковых материалов. Здесь получены обнадеживающие результаты: КПД наших преобразователей состав-



ляет порядка 7%, причем уже видны пути его повышения до 12% (для сравнения, КПД фотопреобразователей на аморфном кремнии – порядка 9% с последующей деградацией до 8%). Органические полупроводниковые структуры хороши тем, что их можно наносить методами печатной электроники непосредственно на полимерные подложки, в том числе – на гибкие пленки. Этот метод технологичен, а потому весьма перспективен.

И, наконец, очень важное для нас направление – фоторефрактивные системы. Интерес к таким материалам в последние годы постоянно растет, поскольку их можно использовать в качестве высокоэффективных активных оптических элементов при передаче информации и регу-

Фоторефрактивный эффект проявляется в системах, для которых характерны фотогенерация электронно-дырочных пар, их разделение, транспорт в приложенном постоянном электрическом поле и захват ловушками, а также нелинейные оптические свойства. Причем мы исследуем материалы с оптической нелинейностью третьего порядка.

Чтобы понять, как реализуется эффект усиления, рассмотрим простой пример. Два лазерных луча направлены на поверхность фоторефрактивного элемента. При взаимодействии двух когерентных лазерных лучей в фоторефрактивной пленке возникает интерференционная картина, в ярких обла-

стях фотогенерируются электронно-дырочные пары. Под воздействием приложенного постоянного электрического поля эти носители движутся в противоположных направлениях, пока не окажутся захваченными ловушками. Захваченные заряды формируют периодическое поле пространственного заряда. Это поле, в свою очередь, вызывает периодическую модуляцию показателя преломления пленки (в силу нелинейности ее оптических свойств). В итоге формируется фазовая дифракционная решетка, причем смещенная относительно интерференционной картины на некоторое расстояние.

Один из лазерных лучей можно считать информацион-

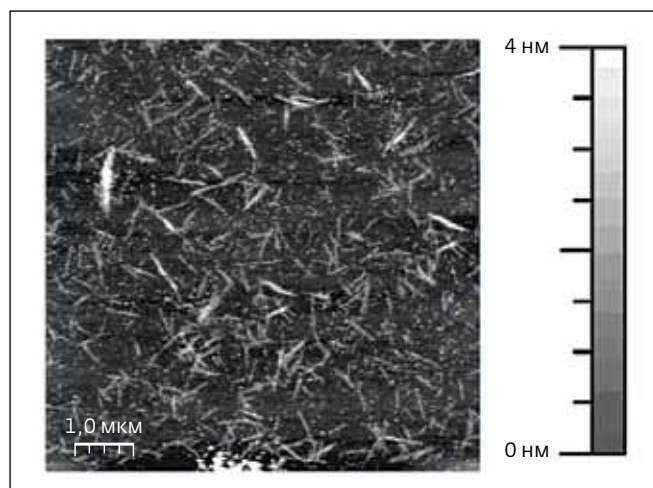
ным, а другой – референтным (накачивающим). Информационный луч, направленный от ярких интерференционных полос к решетке, совпадает по фазе с отраженной от решетки частью референтного луча и их конструктивная интерференция обеспечивает усиление информационного луча. Референтный луч (накачивающий) оказывается противоположным по фазе отраженной части сигнального луча, и их деструктивная интерференция приводит к погашению накачивающего луча. В результате информационный луч усиливается, а накачивающий – ослабляется. Так реализуется механизм усиления.

Данный эффект находит применение в различных обла-

лировании световой энергии в различных электронно-оптических устройствах. Также фоторефрактивные полимерные материалы позволяют записывать динамические фазовые голограммы с высокой дифракционной эффективностью.

Для изучения структуры кристалла очень эффективен АСМ MultiMode. Микрокристаллы находятся в полимерной матрице, но изучаем их отдельно. В частности, мы смогли определить, что структура создаваемых нами кристаллов – типа кирпичной кладки. Такое построение микрокристалла способствует перемещению экситонов между молекулами и, соответственно, усилению фоторефрактивных эффектов. Мы используем АСМ для контроля и анализа сформированных структур. Это очень небольшие и сложные объекты, однако характеристики АСМ позволяют проводить такие исследования.

В целом все системы, которые мы изучаем, – многослойные, толщины слоев составляют от 1 до 100 нм. Это могут быть и полимерные слои, и низкомолекулярные пленки, полученные термическим осаждением в вакууме. И конечно, нам очень важно знать строение поверхности, для чего мы используем атомно-силовые микроскопы. Кроме того, представляют большой интерес сами частицы, которые формируют эти слои. Например, фоторефрактивные материалы должны иметь хорошее поглощение и обладать нелинейными



АСМ-изображение ансамблей $(R_4Pc)Ru(TED)_2$ на поверхности слюды, нанесенных из раствора в хлороформе, после их хранения в течение 18 ч

оптическими свойствами. У отдельных молекул высокое поглощение, но нелинейные оптические свойства выражены недостаточно хорошо. Если эти молекулы образуют какие-то агрегаты, они формируют микрокристалл толщиной в несколько нанометров, а длиной – до сотен нанометров. При этом оптическое поглощение смещается в красную область спектра и резко возрастают нелинейные оптические характеристики, в первую очередь – третьего порядка. Все эти структуры нужно наблю-

стоях. Например, в медицине для оптической томографии – можно просвечивать органы светом в диапазоне 900 нм ("терапевтическое окно"). Фоторефрактивный эффект позволяет выделить из информационного луча так называемый баллистический луч – очень незначительную часть излучения, которая не рассеивается тканями. Используя задержку второго (референтного) луча, при взаимодействии двух лучей на фоторефрактивном материале формируется объемное изображение изучаемого объекта. В результате при медицинских обследованиях можно обойтись ИК-излучением, безопасным для пациентов и персонала. За рубежом это направ-

ление активно развивается. Также перспективно использование усилителей на основе фоторефракции в оптических телекоммуникационных системах, эти работы в самом начале развития.

За рубежом для создания фоторефрактивных материалов используются пластифицированные полимерные композиты и низкомолекулярные дипольные хромофоры. Причем температура стеклования полимерных матриц близка к комнатной. В этих материалах показатель преломления модулируется преимущественно за счет того, что в приложенном периодическом поле происходит пространственная поляризация дипольных хромофоров – т.е. нелинейность

второго порядка. Сами полимерные пленки – вязкие, поскольку должна сохраняться подвижность молекул хромофоров (молекулы поворачиваются, ориентируясь по полю). Полимерные композиты с низкой температурой стеклования имеют высокие фоторефрактивные характеристики. Однако из-за подвижности молекулы могут соединяться друг с другом, происходят димеризация и кристаллизация, теряется дипольный момент молекул, параметры фоторефрактивных пленок со временем деградируют, причем достаточно быстро.

Поэтому сегодня актуально создание твердых фоторефрактивных материалов, чем и занимаются специалисты ►►

дать, измерять их параметры, и для таких задач метод АСМ очень эффективен.

Отмечу, что все это – фундаментальные исследования, тем не менее, полученные результаты достаточно обнадеживающие. Они могут лечь в основу последующих прикладных работ, если найдутся заинтересованные организации.



О применении АСМ в работах совершенно другого рода, в микробиологии, рассказал старший научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии **Олег Вячеславович Батищев**.

Сейчас мы работаем с вирусом гриппа и его компонентами. Занимаемся двумя задачами. Первая из них – исследование процесса самоорганизации каркаса вирусной частицы. Частица вируса гриппа

похожа на морского ежа: торчат шипы поверхностных белков, есть мембрана из липидов, под ней – белковая оболочка. Внутри такого скафандра заключен генетический материал вируса. Когда клетка инфицирована вирусом гриппа, она сама воспроизводит новые вирусные частицы – так в организме происходит следующая стадия инфицирования. Однако для формирования новой вирусной частицы – вириона – все образующие ее белки должны собраться на мембране клетки, в строго определенной временной и пространственной последовательности.

Мы формируем модель клеточной мембраны на подложке, после чего добавляем в систему белок и смотрим, какие структуры он образует в зависимости от состава нашей модельной мембраны. В итоге нужно определить, какие элементы клеточной мембраны являются ключевыми для правильной организации вирусного каркаса. Зная это, можно повлиять на процесс образования вирусной оболочки и помешать этому процессу – разрушить саму оболочку, ингибировать синтез вирусного белка либо его адсорбцию на клеточной мембране.

Процессы самоорганизации белкового каркаса вириона мы наблюдаем с помощью АСМ MultiMode V с контроллером NanoScope IV. Естественно, при изучении процесса на уровне одиночных молекул и структур, которые они формируют, без АСМ не обойтись. Причем работать с биологическими объектами

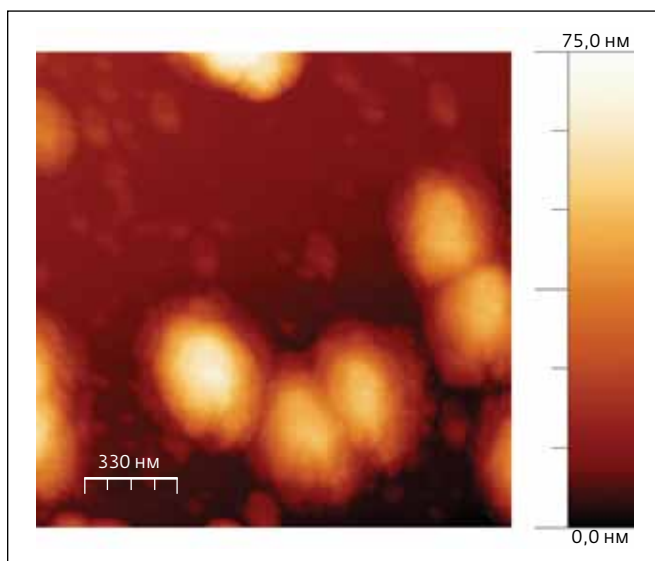
лаборатории. Наши работы отличаются от зарубежных тем, что мы впервые стали использовать нелинейность третьего порядка. Применяем матрицы из твердых полимеров, например, из непластифицированного поливинилкарбазола (PVK), температура стеклования которого – порядка 200°C. Такие структуры достаточно долговечны.

В качестве нелинейных оптических материалов используем молекулы фталоцианинов – соединений фталоцианинов с металлами. Фталоцианины – это органические вещества, которые придают окраску растениям. Молекулы фталоцианина-

тов могут быть двух- и трехпалубного строения, в таких комплексах фталоцианиновые кольца находятся друг над другом, а посередине – ион металла (например, галлия или рутения). Межмолекулярные связи строятся через металл. Из таких молекул формируется нанокристалл. Причем при введении таких нанокристаллов в полимерную матрицу (методом пролива) они располагаются абсолютно хаотично, соответственно, возникает хаотичное centrosymmetric распределение ориентаций дипольных моментов. Приложенное внешнее поле не может изменить ориентацию таких молекул, а в силу цен-

тросимметричности нелинейность второго порядка равна нулю.

Соответственно, проявляться может только нелинейность третьего порядка, а она пропорциональна длине свободного пробега экситона, т.е. линейному интервалу, на котором передается возбужденное состояние молекулы (на расстоянии до 80 нм, дальше этот эффект менее выражен). Если молекулы упакованы в микрорекристалл, то экситоны могут перемещаться на большое расстояние. Поэтому для нас очень важна формируемая структура нанокристаллов фталоцианинов, определяемая способом их получения.



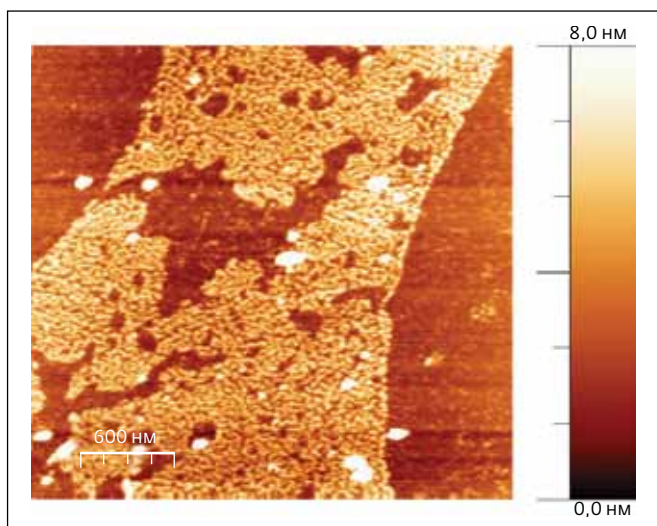
АСМ-изображение вируса гриппа А, полученное в физиологических условиях (в жидкости) на АСМ MultiMode V

необходимо в жидких средах, т.е. в условиях, максимально приближенных к условиям живой клетки.

С помощью АСМ можно не только наблюдать качественные картины процессов, но и определять плотность упаковки и характерные размеры

структур. Например, мы проводили исследования с неким перспективным препаратом – ингибитором образования белкового каркаса вириона. По плотности заполнения оценивали эффективность связывания и смотрели, как она зависит от концентрации ингибитора, от количества белка, действительно ли разрушается структура белкового каркаса вируса. При этом мы не просто наблюдали картину в целом, но и определяли некие константы связывания. Это важно для фармацевтов, чтобы сравнивать наши результаты с параллельно проводимыми исследованиями, например, на клеточных культурах. В итоге корреляция результатов оказалась очень высокой, ингибитор проявил себя должным образом, работы будут продолжены.

Вторая задача в области исследований вируса гриппа – более сложная. Она касается молекулярного механизма проникновения вируса в клетку. Известно, что у вируса гриппа за проникновение отвечает ряд белков на внешней оболочке – так называемые белки слияния. Также известно, что после активации неким триггером (для вируса гриппа это кислотная среда) они начинают видоизменяться (совершать конформационный переход) и пытаются привести в единое целое вирусную мембрану с мем-



АСМ-изображение структур, формируемых матричным (оболочечным) белком вируса гриппа на поверхности слюды. Получено на АСМ MultiMode V

браной эндосомы, чтобы генетический материал вируса мог попасть в область ядра клетки, и в дальнейшем клетка начала бы воспроизводить новые вирусные частицы.

Мы хотим понять, как работает белок слияния. Ведь, несмотря на то, что известна рентгеновская структура такого белка, причем с высоким разрешением, до сих пор нет понимания молекулярного механизма его работы. Предполагается, что один белок не может реализовать весь процесс объединения вирусной и клеточной мембран. Значит, должно работать несколько белков. Но несколько – это сколько? Неизвестно. Непонятен и механизм стабилизации таких белков. Если происходит некое кооперативное действие, значит, должны быть силы, которые удерживают белки в определенной суперструктуре, ответственной за кооперативный конформационный переход. Чтобы измерить такие силы, мы используем АСМ.

Можно закрепить отдельную вирусную частицу на кантилере и далее уже в динамике смотреть, как она будет взаимодействовать с клеточной мембраной, с рецепторами. Важно изучить, как при изменении условий, в частности, при закислении среды, будет активироваться слияние вирусной и клеточной мембран, какие силы развивают отдельные молекулы, какие стадии можно выделить в этом процессе. В результате можно будет понять механизм образования суперструктур белков слияния вируса, определить химические силы, которые лежат в основе этого кооперативного агломерата. А дальше уже искать способ ингибирования данной стадии вирусного инфицирования.

Используя фермент протеазу, который расщепляет пептидную связь между аминокислотами в белках, можно изменять плотность упаковки поверхностных белков вирусных частиц. Поскольку вирусная частица – это живая структура, белки постоянно движутся по ее поверхности, можно искать минимальную структуру, необходимую для слияния вируса с клеточной мембраной. Определить такую минимальную структуру можно по развиваемым силам – т.е. найти некий порог усилия, ниже которого ничего не происходит. Также возможно определить, какие усилия развивает одна молекула. А дальше уже несложно подсчитать, разделив одно на другое, сколько молекул работает в минимальной структуре. Тем самым можно реконструировать эту так называемую розетку белков слияния. А далее, с помощью методов молекулярной динамики, – понять, какие аминокислоты ответственны за такое взаимодействие, и искать, как его ингибировать.

Остановить начальный этап проникновения вируса – было бы самым интересным для фармацевтики, для борьбы с вирусными инфекциями. К подобным работам приступили в начале 2000-х годов и с тех пор ищут ингибиторы слияния. Это направление перспективно еще и тем, что оболочечные вирусы, к которым относятся грипп, герпес, ВИЧ, гепатит, очень схожи по структуре и по механизму проникновения. Наша лаборатория работает с вирусом гриппа, поскольку его легче всего сделать неактивным, безопасным для исследователей. Но результаты вполне могут быть распространены на более опасные заболевания. И если именно на уровне отдельных молекул понять, как реализуются процессы проникновения генетического материала вируса в клетку, будет совершен большой скачок в поиске новых противовирусных препаратов.

Среди других наших исследований, проводимых с помощью АСМ, можно отметить изучение полилизина – это модельный полипептид, характерный очень большим зарядом. Полилизин используется как вспомогательный компонент лекарственных препаратов, для адгезии клеток, для исследования различных воздействий на клеточную культуру. Поэтому интересно посмотреть, как это вещество взаимодействует с клеточными мембранами, какие при этом образуются структуры.

Недавно мы начали исследовать белки, ответственные за клеточный эндоцитоз – захват клеткой внешнего материала. Когда на клетку садится какая-то частица, мембрана должна прогнуться, обволочь частицу и внести внутрь себя для последую-

щего расщепления. Мы изучаем белки, ответственные за создание такого прогиба мембраны, влияние компонентов клеточной мембраны на процесс адсорбции белков. Это важно, поскольку нарушения в работе этих белков приводят к ряду нейродегенеративных заболеваний, например, к шизофрении.

В лаборатории также проводятся исследования, связанные с онкологией. Известно, что с какого-то момента опухоль вызывает подавление иммунной системы. Механизм воздействия опухоли на иммунную систему пытаются объяснить рядом гипотез. В одной из них не последнюю роль играют сложные липиды – ганглиозиды. Они могут вызывать гибель клеток иммунной системы – Т-лимфоцитов. Мы полагаем, что происходит изменение структуры мембраны Т-лимфоцитов под воздействием молекул ганглиозидов, сбрасываемых с поверхности опухолевых клеток. С помощью АСМ смотрели, какие структуры формируются в клеточных мембранах при наличии в растворе таких ганглиозидов. Без АСМ здесь не обойтись, поскольку эти структуры по составу очень близки к мембране и по сути представляют собой домены новой фазы – как лед в воде. Обнаружить образование таких доменов можно только по высоте, которая относительно клеточной мембраны лежит в пределах 1 нм. АСМ MultiMode позволил нам наблюдать изменение структуры и образование доменов под воздействием опухолевых ганглиозидов. Работа ведется активно, и в ближайшие полгода мы надеемся опубликовать ее результаты.

В России и странах СНГ эксклюзивным дистрибьютором корпорации Bruker выступает ООО "ОПТЭК". Руководитель отдела метрологии поверхностей компании ОПТЭК **Ирина Александровна Башкова** рассказала о современных возможностях АСМ Bruker.

Атомно-силовые микроскопы, установленные в ИФХЭ РАН – это далеко не новейшие продукты корпорации Bruker. Прогресс в этой области столь стремителен, что они уже сняты с производства, им на смену пришли новые модели. В частности, сегодня мировой хит продаж в области АСМ – модель MultiMode 8. Если в MultiMode V реализован полуконтактный режим, основанный на фиксации амплитуды и частоты колебаний кантилевера, то один из основных режимов MultiMode 8 – PeakForce Tapping. Этот режим позволяет работать как в жидкости, так и на воздухе, с твердыми и мягкими образцами, с существенно неоднородными структурами поверхностей. PeakForce Tapping лежит



в основе всех уникальных технологий Bruker – PeakForceQNM, PeakForce KPFM и ScanAsyst.

Тем не менее, мы видели, что даже предыдущее поколение АСМ Bruker позволяет решать очень серьезные задачи. И это неудивительно. АСМ MultiMode – мировая классика, универсальный прибор для лабораторий. Лаборатория ИФХЭ РАН – яркий пример того, как достоинства АСМ Bruker проявляются при решении самых разнообразных задач из различных научных областей. Это показывают и многочисленные семинары, которые мы проводим с участием пользователей приборов, чтобы продемонстрировать возможности нашего оборудования.

Важно подчеркнуть, для того чтобы воспользоваться всеми новейшими разработками Bruker, не обязательно приобретать новое оборудование – в ряде случаев достаточно модернизировать уже установленное. Так, например, в случае MultiMode, при замене контроллера NanoScope IV на современный NanoScope V становятся доступными все новые опции Bruker, включая быстрое сканирование – в 20 раз быстрее, чем в обычном режиме. Полностью обновляется и программное обеспечение.

В заключение отмечу, что сегодня компания Bruker предлагает широкую линейку атомно-силовых микроскопов, в которых воплощены все новейшие технологические достижения. Мы видели, что приборы предыдущего поколения позволяют получать выдающиеся результаты. Новые же АСМ открывают перед исследователями поистине безграничные возможности. И наши специалисты готовы помочь ими воспользоваться.

С В.И.Золотаревским, А.В.Ванниковым, О.В.Батищевым и И.А.Башковой беседовали И.В.Шахнович и В.В.Родченкова

