МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ В БИОНАНОСКОПИИ

METROLOGICAL ASSURANCE IN BIONANOSCOPY

УДК 681.2.08

А.Ахметова*, Г.Мешков*, О.Синицына*, И.Яминский* / yaminsky@nanoscopy.net

A.Ahmetova*, G.Meshkov*, O.Sinityna*, I.Yaminsky*

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) успешно переходит из научно-исследовательской области в сектор реальных производственных технологий. Она начинает играть все более важную роль в производственных приложениях биомедицинского характера – бионаноскопии, в частности, при создании уникальных приборов для раннего обнаружения биологических агентов – вирусов и бактерий [1]. В связи с этим существенно повышается роль метрологического сопровождения инструментария СЗМ [2].

Scanning probe microscopy (SPM) is successfully moving from research into the real production. It begins to play an increasingly important role in industrial applications of a biomedical nature, bionanoscopia, in particular while creating the unique devices for the early detection of biological agents – viruses and bacteria [1]. In this regard, significantly increases the role of metrological support of the SPM [2].

В 2012 году при поддержке Метрологического центра "РОСНАНО" авторами разработан эталон высоты для сканирующей зондовой микроскопии на основе вируса табачной мозаики, расположенного на поверхности высокоориентированного пиролитического графита [4]. Вирус табачной мозаики служит эталоном в 17 нм. Эта величина чуть меньше, чем известное значение диаметра вируса в 18 нм, полученное по данным просвечивающей электронной микроскопии. Разница в наблюдаемых значениях может быть обусловлена двумя факторами. Во-первых, при адсорбции вируса на графите может происходить уплощение частицы, что приводит к уменьшению наблюдаемой в атомно-силовой микроскоп высоты. Во-вторых, в просвечивающем электронном микроскопе наблюдается поперечный размер вируса (диаметр), увеличение которого может быть также вызвано адгезионными (поверхностными) силами со стороны подложки.

Размер в биологии имеет ключевое значение. Так, например, биоспецифическое взаимодействие обусловлено в существенной степени геометрией контакта между антигеном и антителом. Вместе с тем, пока метрология нанометрового масштаба разработана очень слабо. Применяемые в настоящее время статические решетки, представляю-

щие собой искусственно созданные на поверхности структуры с заданным профилем, обеспечивают точность измерений около 2 нм. Такие решетки, изготовленные из кремния и других материалов, подвержены деградации, загрязнению поверхности, износу. Кроме того, они достаточно дороги, и, что очень существенно, не позволяют калибровать зондовый микроскоп непосредственно в процессе измерения, например, биологических объектов.

Нами было предложено простое, но вместе с тем очень эффективное решение измерительной меры – эталона нанометра [5-7]. К безусловным достоинствам такой меры относится удобная шкала – ровно один нанометр. Привязка измерительной нанометровой меры к эталону метра осуществляется с помощью интерферометра. Измерительная мера защищена патентом, который передан в общенародное безвозмездное пользование [8].

Измерительная мера (эталон) нанометра изготавливается из пьезокерамической пластины толщиной 0,5-2 мм. На торцах пластины формируются электроды. При приложении напряжения U к электродам за счет обратного пьезоэффекта происходит изменение толщины пластинки на величину:

$$Z = d_{33} U,$$

* МГУ им. М.В.Ломоносова, НПП "Центр перспективных технологий" / Lomonosov Moscow State University, Advanced Technologies Center.

где d_{33} – пьезоэлектрический модуль. Такой эталон обеспечивает точность на уровне 0,001 нм (d_{33} – около $2 \cdot 10^{-10}$ м/В, U – около 5 В).

При использовании измерительной меры в атомно-силовом микроскопе на изображении появляются вертикальные полосы высотой в 1 нм (рис.2). Шириной этих полос можно управлять, изменяя частоту напряжения, прикладываемого к электродам измерительной меры.

Для использования в микроскопии данный эталон выполнен в металлическом корпусе (рис.3), при этом на величину в один нанометр перемещается верхняя крышка корпуса.

Калибровку микроскопа можно проводить и в режиме сканирования. Тогда на "прямоугольный" перепад высот будет накладываться реальный рельеф образца. Во многих случаях регулярный прямоугольный рельеф можно легко отличить от реального рельефа образца.

Эталон нанометра несложно изготовить своими силами в лаборатории зондовой микроскопии. Для этого потребуется пластина пьезокерамики, которую можно приобрести за 10–100 руб., и генератор прямоугольного

Рис.1. Изображение вируса табачной мозаики, полученное на сканирующем зондовом микроскопе "ФемтоСкан". Обработка изображения в программном пакете "ФемтоСкан Онлайн" [3]

Fig.1. Image of the tobacco mosaic virus, obtained in FemtoScan Online scanning probe microscope. Image processing with FemtoScan Online software [3]

In 2012, with the support of RUSNANO Metrology Center the authors have developed the standard of height for scanning probe microscopy based on tobacco mosaic virus located on the surface of highly oriented pyrolytic graphite [4]. The size of tobacco mosaic virus is 17 nm. This value is slightly less than the known value of the diameter of the virus (18 nm), obtained by means of transmission electron microscopy. Two factors can cause a difference in the observed values. First, during the adsorption of the virus to graphite may occur flattening of particles, which leads to a decrease of the height observed in the atomic force microscope. Second, in transmission electron microscope the transverse size of the virus (diameter) is observed, an increase of which can also be caused by the adhesive (surface) forces from the substrate.

Size in biology is crucial. For example, biospecifically interaction

is caused largely by the geometry of the contact between an antigen and antibody. However, the nanometer-range metrology is developed very poorly. The currently used static grids are an artificial structures with the specified profile created on the surface, which ensure the measurement accuracy of about 2 nm. Such grids made of silicon and other materials are susceptible to degradation, contamination of the surface, wear and tear. In addition, they are quite expensive, and, very significantly, do not allow to calibrate scanning probe microscope directly during measurement, e.g. of biological objects.

We proposed a simple, yet very effective solution of the problem – the standard of nanometer [5–7]. The undoubted advantage of such standard is a user-friendly scale – one nanometer. The connection between standards of nanometer and meter is carried out using the interferometer.

The standard is protected by the patent, which was released for free public use [8].

The standard of nanometer is made of piezoelectric ceramic plate with thickness of 0.5–2 mm. At the ends of the plate the electrodes are formed. By applying a voltage U to the electrodes due to the inverse piezoelectric effect the thickness of the plate is changed by the amount:

$$Z = d_{33} U,$$

where d_{33} is the piezoelectric modulus. This standard provides a precision of about 0.001 nm (d_{33} is about $2 \cdot 10^{-10}$ м/В, U is about 5 В).

When using a standard in atomic force microscope, the vertical strips with a height of 1 nm (Fig.2) appear on the image. The width of these strips can be controlled by changing the frequency of the voltage applied to the electrodes of a standard.

Рис.2. Перепад высот эталона составляет 1 нм. Вверху – топографическое изображение, внизу – поперечное сечение
Fig.2. Height difference of the standard is 1 nm. At the top is the topographic image and at the bottom is the cross section

Рис.3. Эталон нанометра в металлическом корпусе для использования в сканирующем зондовом микроскопе (общий вид)
Fig.3. The nanometer standard in a metal housing for use in a scanning probe microscope (general view)

напряжения с частотой в единицы гигагерц и амплитудой около 5 В.

Представленная на рис.3 динамическая измерительная мера (эталон нанометра) создана для выполнения калибровки вертикальной шкалы Z сканирующего атомно-силового микроскопа.

Для калибровки горизонтальной шкалы микроскопа предложены латеральные изме-

For use in microscopy, this standard is manufactured in a metal case (Fig.3), and the top cover of the case moves to size of one nanometer.

The calibration of the microscope can be run in scan mode. Then the real sample topography may overlay the "rectangular" height difference. In many cases, regular rectangular topography can be easily distinguished from the real sample topography.

The standard of nanometer is easy to make on one's own in the laboratory of probe microscopy. This would require a piezoelectric ceramics plate, which can be purchased for 10–100 roubles, and a generator

of rectangular voltage with a frequency of a few Hz and an amplitude of about 5 V.

Shown in Fig.3 dynamic measurement standard is created for calibration of the vertical scale Z of a scanning atomic force microscope. For calibration of a horizontal scale of microscope the lateral standards, which provide movement of the sample in X and Y coordinates, are proposed. To register the movement of the sample in the horizontal plane, a perfectly smooth sample is not suitable, therefore, we propose to use the surface of highly oriented pyrolytic graphite. Moving of the sample in the nanometer range can

be observed by the shift of steps on graphite (Fig.4). This solution is protected by two patents [9, 10].

Accurate calibration of scanning probe microscopes is in demand in case of observation of objects in the range of 10–100 nm. This range includes many viruses of plants, animals and humans. So, typical size of influenza A virus is about 100 nm. ■

Our sincere gratitude to the Ministry of education and science for financial support (project 02.G25.31.0135), the Fund of assistance to development of small forms of enterprises in scientific-technical sphere (project 16315) and the RUSNANO for effective assistance.

Рис.4. Изображение ступеньки на поверхности высокоориентированного пиролитического графита и соответствующий профиль сечения поверхности

Fig.4. The image of the step on the surface of highly oriented pyrolytic graphite and the relevant cross section of the surface

рительные меры, которые обеспечивают перемещение образца по координатам X и Y. Чтобы зафиксировать перемещение образца по горизонтали идеально ровный образец не подходит, поэтому мы предлагаем использовать поверхность высокоориентированного пиролитического графита. Перемещение образца в нанометровом диапазоне можно наблюдать по сдвигу ступени на графите (рис.4). Это решение защищено двумя патентами [9, 10].

Аккуратная калибровка сканирующих зондовых микроскопов востребована при наблюдении объектов в диапазоне 10–100 нм. К этому диапазону относятся многие вирусы растений, животных и человека. Так, типичный размер вируса гриппа А – около 100 нм.

Наша искренняя благодарность Министерству образования и науки за финансовую поддержку (проект 02.G25.31.0135), Фонду содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект 16315), РОСНАНО за эффективную помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dubrovin E.V., Drygin Yu.F., Novikov V.K., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy as a tool of inspection of viral infection, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2007. Vol. 3. Issue 2, P. 128–131.
2. Потемкин А. Если нет точного нанометрового эталона, то нет и индустрии нанотехнологий // Наноиндустрия. 2016. № 3(65). Р. 8–12.
3. Яминский И., Филонов А., Синицына О., Мешков Г. Программное обеспечение "Фем-
- тоСкан Онлайн" // Наноиндустрия. 2016. № 2(64). С. 42–46.
4. Yaminsky I., Filonov A., Sinitsyna O., Meshkov G. FemtoScan Online Software // Nanoindustry. 2016. N 2(64). P. 42–46.
5. Государственный стандартный образец № ГСО 10299-2013 "СО диаметра вируса табачной мозаики на подложке из высокоориентированного пиролитического графита (ГСО ВТМ-ВОПГ-ЦПТ)" Свидетельство № 3366.
6. Яминский И.В. Линейка длиной в один нанометр // Квант. 2009. № 4. 4–6.
7. Мешков Г., Синицына О., Яминский Д., Яминский И. Динамическая измерительная мера "Нанометр" // Наноиндустрия. 2012. № 6(36). Р. 40–43.
8. Голубев С., Захарьин В., Мешков Г., Токунов Ю., Яминский Д., Яминский И. Калибровка зондовых микроскопов. Динамическая мера "Нанометр" // Наноиндустрия. 2012. № 8(38). С. 42–46.
9. Яминский Д.И., Яминский И.В. Калибровочный эталон для профилометров и сканирующих зондовых микроскопов. Патент на изобретение № 2386989.
10. Мешков Г.Б., Яминский Д.И., Яминский И.В. Калибровочный эталон для профилометров и сканирующих зондовых микроскопов. Патент на изобретение № 2538029.
11. Мешков Г.Б., Яминский Д.И., Яминский И.В., Оленин А.В. Калибровочный эталон для профилометров и сканирующих зондовых микроскопов. Патент на изобретение № 2538024.