ПОВЕРХНОСТЬ. РЕНТГЕНОВСКИЕ, СИНХРОТРОННЫЕ И НЕЙТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, 2000, № 7, с. 63–66

УДК 620.186:53.087.22

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДИКИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИСТИННЫХ ТОПОГРАФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОБЪЕКТОВ ПО ИЗМЕРЕННЫМ АСМ-ИЗОБРАЖЕНИЯМ. 2. ЭФФЕКТ УШИРЕНИЯ АСМ-ПРОФИЛЯ

© 2000 г. М. О. Галлямов, И. В. Яминский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.11.99 г.

Разработана методика количественного описания эффекта уширения в АСМ, позволяющая восстановить реальные геометрические параметры объекта по двум измеренным параметрам АСМ-профиля (высота и ширина на полувысоте). Применение методики позволило получить информацию о количественном молекулярном составе комплекса ДНК–ПАВ.

ВВЕДЕНИЕ

Эффект уширения проявляется в том, что микрообъекты, визуализованные АСМ, имеют завышенные латеральные размеры. Например, при АСМ-исследованиях молекул нуклеиновых кислот [1] этот эффект облегчает идентификацию молекул: “уширенные” молекулы (ширина профиля молекулы ДНК завышается в 5–10 раз) легче обнаружить на кадре значительной площади, что облегчает набор статистики. В силу этого, при исследовании нуклеиновых кислот, эффект уширения позволяет обходиться без дополнительного контрастирования макромолекул (уранилацетатом 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). Большее давление приводит к большим контактным деформациям зонда и образца, что сказывается на увеличении как латеральных размеров области контакта (ограничение достижимого пространственного разрешения), так и радиусов кривизны контактирующих поверхностей.

Уменьшить контактные деформации можно при наблюдении поверхности образцов в жидкостях, поскольку в этом случае можно поддерживать контактные силы на существенно более низком уровне [2]. Однако здесь могут возникать новые проблемы, среди которых мы упомянем проблему фиксации образца на твердой подложке.

Для восстановления реальной геометрической формы объекта по его АСМ-изображению необходим дополнительный математический анализ с использованием модельных представлений о геометрии зонда (конус со сферическим кончиком, параболоид и пр.) и априорных представлений о форме объекта исследования.

В работе [3] 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) существенно завышены при условии, что радиус кривизны объекта меньше радиуса кривизны кончика зонда (ошибка тем выше, чем больше разница соответствующих радиусов). Это обстоятельство осложняет применимость рассматриваемой методики при исследованиях биообъектов (макромолекул, их комплексов и пр.) в силу малости размеров последних в сравнении с радиусом кривизны кончика зонда АСМ.

В работе [4] предложена методика восстановления объема исследуемых частиц (по АСМ-профилю), не включающая стадию предварительного тестирования зонда: как геометрия зонда, так и геометрия объектов исследования могут быть восстановлены путем анализа одного и того же АСМ-изображения. Однако данная методика включает априорное предположение о сферической форме исследуемых объектов. В силу пред-

ставлений о существенной роли контактных деформаций в исследованиях АСМ данное предположение вряд ли оправдано при решении задачи восстановления геометрии биообъектов, характеризующихся невысокими значениями модуля упругости. Более общей является модель, позволяющая учесть эффект уширения при контакте иглы с деформированной частицей, имеющей эллипсоидальное сечение. Но, насколько нам известно, в литературе отсутствуют работы, посвященные применению данной модели для анализа экспериментальных АСМ-изображений, что, по-видимому, обусловлено алгебраическими сложностями, возникающими при нахождении аналитического решения этой задачи.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ О ВОССТАНОВЛЕНИИ РЕАЛЬНОЙ ШИРИНЫ ОБЪЕКТОВ ПО ИЗМЕРЕННОМУ АСМ-ПРОФИЛЮ

Мы применили для учета эффекта уширения геометрическую модель (рис. 1), 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 (сечение иглы – парабола: $y = kx^2$, где k – коэффициент аппроксимации). Было показано, что результаты применения двух методик близки. Количественное расхождение в ответах не превышает 3–9%. Стоит отметить, что аппроксимация иглы с помощью полусферы более наглядна и шире используется в литературе. Мы ниже приводим алгоритмы обоих подходов.

Исследуемая частица описывалась моделью сплюснутого эллипсоида (с полуосями a, b, c), т.е. мы исходим из априорных представлений о контактной деформации образца под действием зонда. Ставилась задача по заданным значениям b ($b = h/2$), R (или k для параболической аппроксимации) и d (где d – измеренная ширина профиля АСМ-изображения частицы на ее полувысоте) найти значение a.

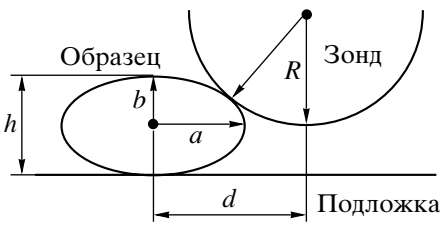

Рис. 1. Геометрия контакта зонда и образца. К объяснению эффекта уширения.

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

$$\begin{cases} y_{\text{эл}} = b\sqrt{1 - x^2/a^2} \\ y_{\text{ок}} = R - \sqrt{R^2 - (x - d/2)^2}. \end{cases}$$

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

Для решения задачи ставились 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):

$$\begin{cases} b\sqrt{1 - x_0^2/a^2} = R - \sqrt{R^2 - (x_0 - d/2)^2} \\ dy_{\text{эл}}/dx|_{x_0, y_0} = dy_{\text{ок}}/dx|_{x_0, y_0}. \end{cases} \quad (1)$$

Для модели параболической иглы в системе (1) вместо уравнения окружности используется уравнение параболы.

Данная система аналитически сводилась к одному уравнению с одним неизвестным x_0, для которого был создан алгоритм численного решения. Далее по найденному x_0 определялось a. Приведем эти уравнения для сферической иглы:

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

для нахождения a по численно определенному x_0:

$$a = \frac{x_0}{\sqrt{1 - [R - \sqrt{R^2 - (x_0 - d)^2}]^2 / b^2}}. \quad (3)$$

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

$$k^2(x_0 - d)^3(x_0 + d) + b^2 = 0 \quad (4)$$

и уравнение для определения a:

$$a = \sqrt{\frac{x_0(x_0 + d)}{2}}. \quad (5)$$

Аналитически было показано, что уравнение (2) для сферической иглы не имеет единственного решения (на соответствующем промежутке) толь-

ко в том случае, когда выполняется система неравенств:

$$\begin{cases} R > d/2 \\ b > R - \sqrt{R^2 - d^2/4}. \end{cases} \quad (6)$$

Аналогично, уравнение для параболической иглы (4) не имеет единственного решения (на интересующем нас интервале) в случае, когда выполняется неравенство:

$$b > kd^2. \quad (7)$$

Смысл данных ограничения очевиден: если АСМ-профиль достаточно "острый", то и игла, с помощью которой он был прописан, также должна быть "острой" настолько, насколько это определяется соотношениями (6) или (7).

Уравнения (2)–(5) использовались для построения численного решения. Поскольку задача решалась численно, то для реализации решения можно было бы попробовать непосредственно использовать систему (1), сведя ее, например, к системе нелинейных уравнений. 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 важное преимущество: проверка выполнения условий (6) и (7) позволяет заранее определить случаи отсутствия решений.

Эта проверка позволяет извлечь дополнительную и весьма важную информацию о свойствах зондирующего острия: определить верхнюю границу для значений радиуса кривизны кончика R (соответственно, нижнюю для коэффициента параболы k).

Определение точного значения радиуса R (или k) для конкретного зонда требует его тестирования непосредственно перед использованием (с помощью тест-объектов, например вирусных частиц [5]). Однако и в этом случае существует вероятность того, что в процессе сканирования форма иглы претерпит изменения в результате взаимодействия с объектом. В этой связи полезным является получение информации о форме зонда непосредственно из АСМ-изображений объекта исследования.

Путем набора статистики параметров высоты и ширины профиля АСМ-изображений объектов исследования и последующего анализа выполнимости соотношений (6), (7) для набранной статистики можно определить предельное значение R

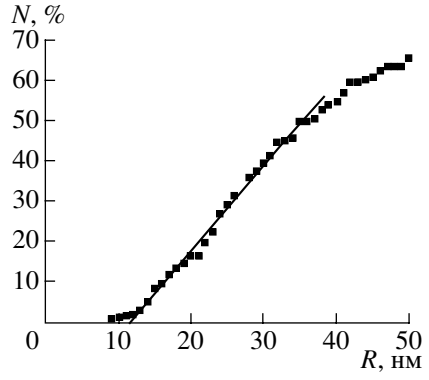

Рис. 2. Зависимость числа случаев отсутствия решения N от радиуса аппроксимации иглы. Проверка выполнимости условия (6).

(или k), выше (или ниже) которого рост числа случаев отсутствия решения. Это и будет верхнее граничное значение для оцениваемого радиуса кривизны иглы (рис. 2). Нижняя граница для радиуса кривизны зонда определяется контактными деформациями.

К вопросу о применимости разработанной методики. Следует подчеркнуть, что разработанная методика не учитывает возможного дополнительного вклада в уширение, связанного с частичным увеличением образца зондом при сканировании. Этот эффект обусловлен латеральными силами взаимодействия зонда и образца, которые характеризуются значительной интенсивностью при проведении исследований в контактном режиме на воздухе, даже при минимизации нормальных сил. 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 d и, как следствие, восстанавливаемого значения a.

Степень увеличения образца зондом можно снизить при уменьшении интенсивности латерального силового воздействия зонда. Это достигается при применении режима прерывистого контакта. Максимальный эффект уменьшения латеральных сил достигается при измерениях в жидких средах.

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗРАБОТАННОГО АЛГОРИТМА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОЛОГИИ КОМПЛЕКСОВ ДНК–ПАВ

Мы применили разработанную методику для восстановления геометрии комплексов ДНК с поверхностно-активными веществами (ПАВ), перешедших через границу раздела фаз вода/хлороформ [6]. Для каждой тороидальной частицы измерялись диаметр тора, ширина профиля на по-

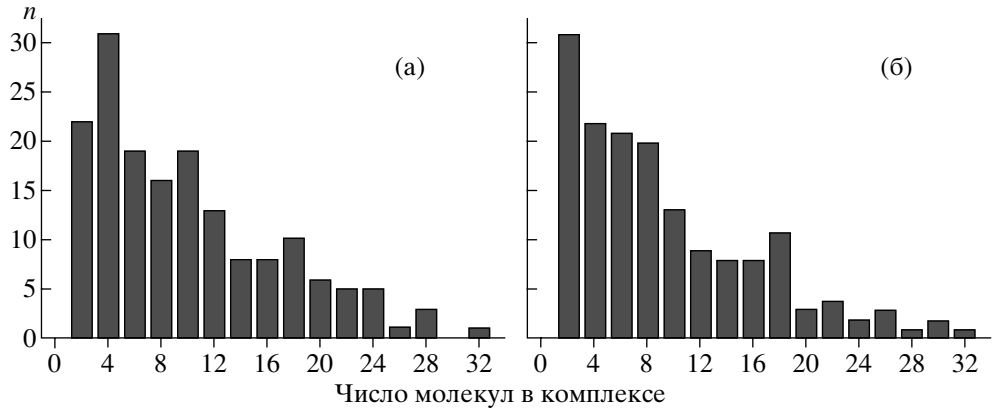

Рис. 3. Гистограммы распределения числа молекул ДНК, входящих в состав комплексов с ПАВ, с радиусами $R = 6$ (а) и 12 (б) нм; n – число комплексов.

лувысоте и высота над подложкой, средние значения этих параметров составили: $D \sim 100$ нм, $d \sim$ ~ 25 нм и $h \sim 5$ нм. Две последние величины использовались при восстановлении истинной ширины профиля частицы $2a$ по изложенной методике.

На рис. 2 представлен график зависимости числа случаев отсутствия решения от радиуса аппроксимирующего зонда, полученный путем тестирования выполнения условий (6) или (7). Можно сделать вывод, что верхняя граница значения R, характеризующего зонд, используемый при визуализации комплексов, составляет 12 нм (соответствует $k = 5.5 \times 10^{-2}$ нм^{1}) – выше этого значения наблюдается линейный рост числа случаев отсутствия решения.

Мы подсчитали количество молекул ДНК, приходящихся на каждую тороидальную структуру, используя два значения R 6 и 12 нм (соответствует k 13.2×10^{-2} и 5.5×10^{-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, как правило, значения для a на 3–9% выше. В рассматриваемом случае соответствующие численные решения составляют 12 и 11 нм. Таким образом, мы показали, что формой комплекса ДНК–ПАВ является сплюснутый тор. Восстановление геометрии комплекса позволяет провести количественный анализ его молекулярного состава (рис. 3).

Авторы выражают благодарность О.А. Пышкиной и А.С. Андреевой (Химический факультет МГУ) за помощь при приготовлении образцов комплексов ДНК–ПАВ. Работа была поддержана РФФИ, грант № 97-03-32778а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bustamante C., Vesenka J., Tang C.L. et al.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 22.
2. *Hansma H.G., Vesenka J., Siegerist C. et al.* // Science. 1992. V. 256. P. 1180.
3. *Бухараев А.А., Овчинников Д.В., Бухараева А.А.* // Заводская лаборатория. 1997. № 5. С. 10.
4. *Garcia V.J., Martinez L., Briceno-Valero J.M., Schilling C.H.* // Probe Microscopy. 1998. V. 1. № 2. P. 117.
5. *Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V.* // FEBS Letters. 1998. V. 425. P. 217.
6. *Андреева А.С., Галлямов М.О., Пышкина О.А. и др.* // Ж. физ. хим. 1999. Т. 73. № 11. С. 2062.

Quantitative Methods for Deconvolution of True Topographical Properties of Object on the Basis of Measured AFM-Images. 2. Broadening Effect

M. O. Gallyamov, I. V. Yaminsky

Technique of the quantitative description of image broadening effect in AFM allowing to restore real geometrical parameters of object using two-parameters model (height and width at half-height) is developed. Application of the technique has allowed to receive the quantitative information about molecular structure of DNA-surfactant complexes.