

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

**Mikroskopie atomárních sil biologických  
materiálů**

**Radka Zeisková**

**Bakalářská práce**  
**2012**

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**  
**Akademický rok: 2011/2012**

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radka ZEISKOVÁ**  
Osobní číslo: **C08242**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**

Název tématu: **Mikroskopie atomárních sil biologických materiálů**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

**Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

- 1) Zpracujte literární rešerši na téma využití technik mikroskopie skenovací sondou pro studium biologických vzorků. Porovnejte metody STM a AFM. U posledně zmíněné techniky popište možné režimy práce přístroje a jeho konstrukci.
- 2) Seznamte se s problematikou zobrazení v mikrobiologii.
- 3) Seznamte se s problematikou zobrazení virových částic a nukleových kyselin pomocí AFM.
- 4) Proveďte praktická měření biologických vzorků na AFM mikroskopech na KOAnCh, resp. na SLCHPL UPce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí závěrečné práce:

**Prof. Ing. Miroslav Vlček, CSc.**

Katedra obecné a anorganické chemie

Konzultant bakalářské práce:

**Doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**3. října 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

Ph. D.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková,

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2012

## **PROHLAŠUJI:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 6. 2012

Radka Zeisková

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych na tomto místě poděkovat doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za zadání velmi zajímavého tématu bakalářské práce, prof. Ing. Miroslavu Vlčkovi, CSc. z Katedry obecné a anorganické chemie a Ing. Dagmar Holubcové z Katedry biologických a biochemických věd za poskytnutí cenných rad, konzultací a podkladů pro vypracování této bakalářské práce. Děkuji také Ing. Karlu Pálkovi z Katedry obecné a anorganické chemie Fakulty chemicko-technologické za seznámení s měřicím přístrojem a spolupráci při měření samotném.

Dále děkuji své rodině, která mi dala možnost studovat vysokou školu a po dobu studia mě finančně i morálně podporovala.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce je zaměřena na problematiku zobrazování biologických materiálů prostřednictvím metod Mikroskopie skenující sondou (SPM), zejména Mikroskopii atomárních sil (AFM). AFM je nejrozšířenější technika mikroskopie se skenující sondou, která pracuje na principu těsného přiblížení měřící sondy ke vzorku. Teoretická část zahrnuje popis skenovacích mikroskopických metod, konstrukci mikroskopu, jednotlivé měřící módy a techniky. V předkládané práci je velká pozornost věnována zobrazování biologických materiálů, biologickým aplikacím, podkladním materiálům a způsobům imobilizace vzorků na tyto nosiče. Experimentální část se zabývá přípravou mikrobiologických vzorků (*B. cereus*, *S. intermedius* a *K. oxytoca*), jejich imobilizací na substrát a skenováním pomocí mikroskopu AFM.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

SPM; AFM; STM; Mikroskopie atomárních sil; skenující sonda; DNA; imobilizace, biologické vzorky

## **ABSTRACT**

Bachelor thesis is focused on imaging of biological materials by Scanning Probe Microscopy (SPM) techniques, especially Atomic Force Microscopy (AFM). AFM is the most widely used technique in scanning probe microscopy, which works on the principle of a close encounter measuring probe to the sample. The theoretical part includes a description of scanning microscopic methods, construction of the microscope, the various modes and measurement techniques. The present work is focused mainly on imaging of biological materials, biological applications, underlay materials and methods of immobilization of samples on these carriers. The experimental part deals with the preparation of microbiological samples (*B. cereus*, *S. intermedius* a *K. oxytoca*), their immobilization on a substrate and scanning by microscope AFM.

## **KEY WORDS**

SPM; STM; AFM; Atomic Force Microscopy; scanning probe; DNA; immobilization, biological samples

# OBSAH

<b>1. Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část</b>	<b>10</b>
2.1. Mikroskopie skenující sondou – vývoj	10
2.2. Obecné schéma SPM mikroskopu	11
2.2.1. Pohybové zařízení	12
2.2.1.1. Hrubý posuv	12
2.2.1.2. Jemný posuv	12
2.2.1.3. Rastrování	13
2.2.1.4. Piezoelektrika	13
2.2.1.5. Elektrodynamické skenery	15
2.2.1.6. Nelinearita skeneru	15
2.2.2. Hroty a nosníky	18
2.2.2.1. Hroty pro STM	18
2.2.2.2. Hroty a cantilevery pro AFM	18
2.2.3. Detekce ohybu cantileveru	21
2.2.3.1. Indikace laserem	21
2.2.3.2. Indikace změnou kapacity	22
2.2.3.3. Indikace piezorezistivní	22
2.2.3.4. Indikace pomocí STM	22
2.2.3.5. Indikace polarizovaným světlem	22
2.3. Skenovací tunelovací mikroskopie – STM	23
2.3.1. Tunelový jev	23
2.3.2. Vlastní měření	23
2.4. Mikroskopie atomárních sil – AFM	24
2.4.1. Síly působící v AFM	24
2.4.1.1. Van der Waalovy síly	24
2.4.1.2. Síly krátkého dosahu	25
2.4.1.3. Kapilární síly	25
2.4.2. Režimy AFM	25
2.4.2.1. Dotykový režim – Contact mode (C-AFM)	25
2.4.2.1.1. Dotykový režim s konstantní výškou	26

2.4.2.1.2.	Dotykový režim s konstantní silou	26
2.4.2.2.	Bezdotykový režim – Noncontact mode (NC-AFM)	27
2.4.2.3.	Pokleповý režim – Tapping mode (semicontact mode)	28
2.5.	Odvozené techniky SPM doplňkové k AFM	28
2.6.	Aplikace AFM	29
2.6.1.	Analýza povrchů	29
2.6.2.	Analýza nanočástic	30
2.6.3.	Nezobrazující technika	30
2.6.4.	Biologické aplikace	31
2.6.4.1.	Nukleové kyseliny	31
2.6.4.2.	Proteiny	33
2.6.4.3.	Biopolymery	33
2.6.4.4.	Membrány	34
2.6.4.5.	Buňky	34
2.6.4.6.	Tkáně	36
2.7.	Substráty pro AFM	37
2.8.	Imobilizace molekul	38
2.9.	Pracovní prostředí AFM mikroskopů	39
<b>3.</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>40</b>
3.1.	Materiál a příprava vzorku	40
3.1.1.	Mikroorganismy	40
3.1.2.	Pomnožovací půda	40
3.1.3.	Příprava vzorku	41
3.2.	Měřicí přístroj	41
3.2.1.	Skenování vzorků	42
<b>4.</b>	<b>Výsledky měření a diskuze</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>Závěr</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Přílohy</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Použitá literatura</b>	<b>50</b>



# 1. ÚVOD

Mikroskopie skenující sondou (SPM - Scanning Probe Microscopy) je soubor experimentálních metod určených ke studiu struktury povrchu s nanometrovým laterálním rozlišením a až subnanometrovým rozlišením ve směru kolmém k povrchu, případně k měření některých lokálních vlastností povrchů. Používá se ke stanovení trojrozměrných obrazů povrchu a jejich parametrů v souřadnicích x, y, z. Tyto techniky využívají těsného přiblížení měřicí sondy ke vzorku – pracují v oblasti blízkého pole. Od roku 1981 kdy byla objevena metoda Skenovací tunelové mikroskopie (STM – Scanning Tunneling Microscopy), zaznamenala SPM bouřlivý rozvoj. Vzniklo velké množství příbuzných technik založených na různých fyzikálních jevech. Následovala Skenovací kapacitní mikroskopie (SCM – Scanning Capacitance Microscopy), Mikroskopie atomárních sil (AFM – Atomic Force Microscopy), Mikroskopie magnetických sil (MFM – Magnetic Force Microscopy) a mnoho dalších odnoží.

V předkládané práci je velká pozornost věnována teoretickému zpracování principů a popisu měření technikami Mikroskopie skenující sondou, zejména metodou AFM. Uveden je popis obecné stavby SPM mikroskopu, pracovní režimy AFM a jejich vhodné použití. Dále je věnována pozornost zobrazování v mikrobiologii pomocí AFM, např. zobrazování virových částic a nukleových kyselin. Zmíněné jsou další biologické aplikace, popis přípravy vzorku před měřením a vhodný výběr prostředí, ve kterém se bude měřit.

Vlastní praktické měření biologických vzorků bylo prováděno na Katedře obecné a anorganické chemie, kde mají dva SPM mikroskopy. Oba jsou produkty ruské firmy NT – MDT. Starší mikroskop NanoEducator model SPM-U-L5, novější SOLVER NEXT, oba pracují v režimech STM i AFM. Protože předmětem měření budou málo vodivé vzorky (biologické materiály), praktická část práce bude věnována technice AFM.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. MIKROSKOPIE SKENUJÍCÍ SONDOU - VÝVOJ

V roce 1928 E. H. Synge popsal první teoretický návrh optického zobrazení ostrým skleněným hrotem těsně nad povrchem vzorku. Pro nereálné sestavení takového přístroje zůstal návrh bez povšimnutí. Experimentální ověření Syngeova teoretického principu roku 1972 provedl E. A. Ash. Ve stejném roce R. Young sestrojil svůj Topografiner, zařízení, které pracuje v emisním režimu, schopné mapovat topografii vodivých vzorků. Byla nastíněna možnost využití tunelového jevu pro lepší rozlišení. První úspěšná realizace tunelování proběhla roku 1981 v laboratořích IBM v Curychu, kdy u jejího zrodu stáli **Gerd Binnig** a **Heinrich Rohrer**. Tím byl položen základ Skenovací tunelové mikroskopie – STM (Scanning Tunneling Microscopy). Přístroj pracoval ve vakuu a vibrace byly tlumeny magnetickou levitací, tj. forma tlumení vibrací, při které je citlivá část zařízení či celé zařízení udržováno ve vznosu na magnetickém polštáři. O pět let později získali Binnig a Rohrer za svůj objev Nobelovu cenu. Při měření STM byly pozorovány systematické odchylky, jež se daly vysvětlit silovým působením mezi hrotem a povrchem. Na základě těchto sil byla roku 1986 realizována nová metoda Mikroskopie atomárních sil (AFM – Atomic Force Microscopy), schopná studovat i nevodivé vzorky. V roce 1989 výzkumník D. Eigler z laboratoře BMI objevil, že za určitých podmínek sonda STM přitahuje atom na povrchu krystalové mřížky a může s ním pohybovat po tomto povrchu. Od tohoto roku se Mikroskopie skenující sondou využívá k modifikaci vzorku a tvorby struktur v nanometrové oblasti. [1], [2], [21]

V roce 1994 byla zkonstruována nová varianta AFM mikroskopu, tzv. FM-AFM mikroskop (Frequency Modulated AFM). Princip metody spočívá v kmitání raménka harmonickou silou na vlastní frekvenci a vyšších harmonických frekvencích. Měření je fázový posuv kmitání způsobený atomárními silami. Právě touto technologií bylo v roce 2004 dosaženo zatím největšího rozlišení: 77 pikometrů ( $77 \times 10^{-12}$  m). V tomto rozlišení je již možné rozeznat struktury uvnitř jednotlivých atomů! Experiment provedli J. Mannhart, T. Kopp a F. J. Giessibl na německé universitě v Augsburgu. Mikroskopie se tak dostala poprvé na hranici pikometrové oblasti. [3]

Dodnes probíhá v těchto technikách bouřlivý rozvoj, který vede ke zkracování vykreslovací doby, ke zvětšování rozlišovací schopnosti a umožňuje nové aplikace.

## 2.2. OBECNÉ SCHÉMA SPM MIKROSKOPU

Schéma obecného uspořádání SPM mikroskopu je uvedeno na obr. 1, kde jsou zobrazeny jeho hlavní funkční části:

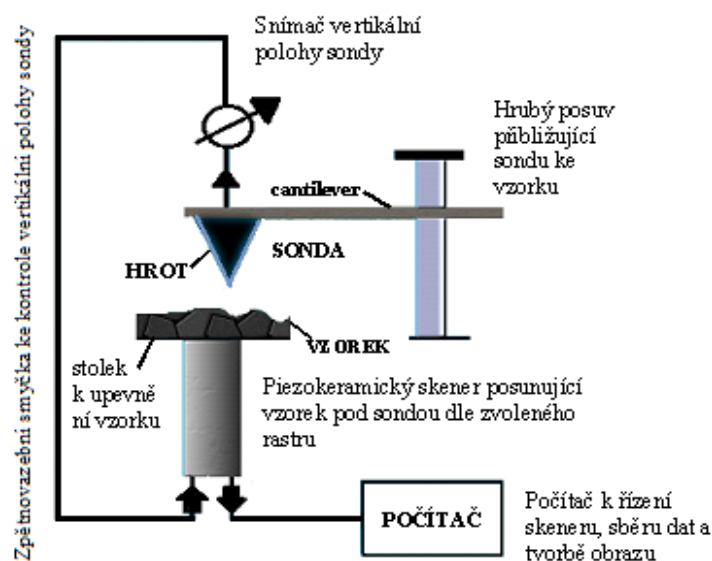
**Mechanická část**, která zajišťuje mechanickou stabilitu - stůl k upevnění vzorku, polohování ve třech rozměrech (souřadnice  $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) - polohovací zařízení (tzv. skenery – piezokeramické pohybové členy, které jednak vytváří měřicí rastr, jednak přibližují či oddalují sondu).

**Vlastní sonda** je uchycena v držáku, je tvořena zpravidla ostrým hrotem a nosnou částí tzv. cantileverem (nosník, raménko) a zprostředkovává měřicí interakci. Konkrétní typ sondy závisí na použité mikroskopii.

**Elektronická část**, která zajišťuje napájení, součinnost všech částí, obvody zpětné vazby, ovládání a sběr naměřených hodnot. Detektor snímá směrodatnou veličinu (proud, posunutí). Někdy je přímo sondou, někdy potřebuje ještě aktivní část jako je např. laser u AFM, který měří míru její interakce s povrchem.

**Pomocné vybavení** je důležitou vnější částí např. součástky pro tlumení mechanických vibrací, vakuové vývěvy, generátory magnetického pole, kryostaty, zařízení pro úpravu vzorku (čištění, relaxace) apod.

Další uspořádání mikroskopu a vlastnosti používaných součástí se mění podle toho, pro jakou konkrétní metodu mikroskopie SPM je daný mikroskop určen. [1], [2], [23], [25]



**Obr. 1** Schéma obecné stavby SPM mikroskopu (sonda není zobrazena v měřítku)

převzato a upraveno z [2]

Sonda interakcí se vzorkem mění svůj stav, který je snímán senzorem a přes obvod zpětné vazby je ovlivňováno prodloužení piezokeramiky. Změna délky je přenášena zpravidla pomocí změny napětí na piezokeramice do počítače, který sestavuje obraz.

## **2.2.1. POHYBOVÉ ZAŘÍZENÍ**

Pohybové zařízení tzv. skener je velmi důležitou částí mikroskopu, neboť umožňuje vzájemné přibližování hrotu a vzorku a při měření s konstantním proudem či konstantní silou je i nositelem měřonosného signálu. Z technického hlediska je nutno zajistit dvě polohovací funkce a to makroskopický a nanoskopický pohyb. Není totiž možné splnit všechny požadavky jedním mechanickým systémem.

### **2.2.1.1. Hrubý posuv**

Hrubý (makroskopický) posuv se používá pro přiblížení vzorku směrem k hrotu (případně hrotu ke vzorku). V prvních typech mikroskopů bylo použito zařízení, tvořené dvěma kolnými piezoelektrickými destičkami, k nimž byly připojeny tři vodivé nožičky, oddělené od podkladové vodivé desky izolantem s vysokou permitivitou. Pohyb byl uskutečňován postupným elektrickým přichycováním nožiček a následnou aktivací některé piezoelektrické destičky.

Hrubý posuv může být realizován *mechanickým šroubem* (dává přesně definovaný krok, ale může vnášet vibrace nebo ohřev soustavy), *kluzně* (využívá smýkavý pohyb různou rychlostí v opačných směrech), *chodítkem* (elektrostatické nebo piezoelektrické přichycování), *inchworm* (motor pracuje „píďalkovitým“ pohybem).  
[1], [2]

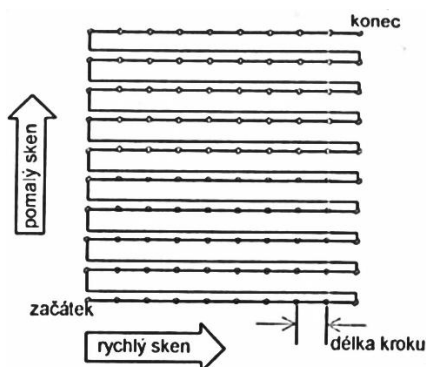
### **2.2.1.2. Jemný posuv**

K pohybu během vlastního měření slouží jemný posuv - skener, realizovaný téměř vždy piezoelektrickými materiály, protože požadavky na přesnost nelze mechanickým zařízením splnit. Důležitou konstrukční informací je skutečnost, zda-li skener pohybuje vzorkem nebo hrotem.

### 2.2.1.3. Rastrování

Téměř všechny skenovací sondové mikroskopy využívají pro přesné nastavení a pohyb sondy nad povrchem vzorku piezoelektrický skener. Skener se pohybuje ve směru prvního řádku rastru tam a zpět, posune se kolmo o určitou polohu a vykoná opět posun tam a zpět. Tak probíhá skenování přes celou měřenou plochu. Při zpáteční cestě sonda nenabírá data, ale pohybuje se rychle zpět na výchozí pozici a na další řádek. Pohyb při nabírání dat je rychlý, naopak posuv na další řádek je označován jako pomalý sken. Skener většinou vykonává i přibližovací a měřicí pohyb ve směru kolmém k povrchu.

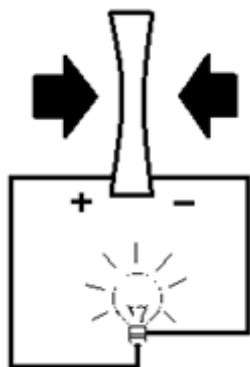
Jednotlivé měřicí body jsou zpravidla rozmístěny ekvidistantně – zachovávají mezi sebou konstantní vzdálenost. Mezery mezi datovými body jsou označovány jako velikost kroku. Krok je určen délkou řádku dělenou počtem dat na řádek. Obvykle se délka řádku v SPM režimech pohybuje od několika desítek nm po stovky  $\mu\text{m}$ . Počet bodů na řádek bývá od 64 do 1024 obrazových bodů. V ideálním případě tvoří rastr čtvercovou mřížku jako na obr. 2. [1]



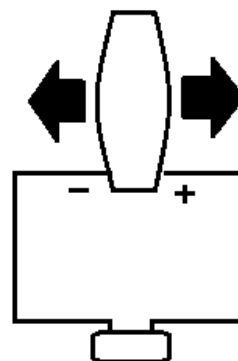
Obr. 2 Pohyb skeneru při sběru dat [1]

### 2.2.1.4. Piezoelektrika

Piezoelektrické vlastnosti mají některé látky tvořící krystaly, které nemají střed souměrnosti. Mechanické namáhání (tlak, tah, ohýbání, kroucení) krystalu takovéto látky vyvolává na plochách krystalu elektrické náboje. V takovém případě se jedná o **přímý piezoelektrický jev** (Obr. 3a). **Nepřímý piezoelektrický jev** (Obr. 3b) pracuje opačně. Vnější elektrické pole způsobuje deformaci krystalu, což se využívá v konstrukcích SPM mikroskopů. Po přiložení přesně definovaného napětí na pohybové zařízení z piezoelektrického materiálu, dojde k potřebnému posunu vzorku nebo skenovací hlavy. Názorné video dostupné z [24].



*Obr. 3a Přímý piezoelektrický jev*



*Obr. 3b Nepřímý piezoelektrický jev*

Základním piezokrystalickým materiálem většiny skenerů je keramická směs PZT, což je  $\text{Pb}(\text{Zr,Ti})\text{O}_3$  – olovnatý zirkonium titanát, která se dotuje různými příměsemi pro dosažení požadovaných vlastností. Výroby je založená na slinování (spékání) práškového materiálu, který je před vlastním slinutím slisován. Každý krystal v tomto polykrystalickém materiálu má svůj elektrický dipólový moment. Dipólové momenty jsou potom základem schopnosti skeneru reagovat na přivedené napětí.

Po slinutí jsou dipólové momenty krystalů orientovány nahodile, musí se proto po spečení piezoelektrický krystal opět zahřát (na teplotu vyšší než  $200^\circ\text{C}$ ) a vystavit stejnosměrnému napětí, které jednotlivé dipóly orientuje jedním směrem. Potom se vzorek rychle zchladí, čímž si dipóly uchovávají svou orientaci.

Piezoelektrická konstanta  $d$  udává velikost změny rozměrů po přiložení napětí na danou piezokeramiku. Konstanta je závislá na teplotě. Při nižší teplotě má menší hodnotu, což umožňuje přesnější nastavování, ale menší rozsah. Piezoelektrické skenery mohou být konstruovány pro pohyb v osách  $x$ ,  $y$  a  $z$  tak, že v jednom směru se roztahují (extenze) a v opačném smršťují (kontrakce).

Piezoelektrická keramika pro konstrukci skenerů se používá v několika tvarových modifikacích: pásek, bimorfnní pásek, spojení disků, laminát nebo dutá trubička.

Uvedené prvky mohou realizovat pouze jeden nezávislý pohyb a nebylo by tedy možné je samostatně použít ke skenování. Je nutno použít jejich kombinace či úpravy, čímž se dosahuje co největší rezonanční frekvence, pevnost, linearita a rozlišení. Nejčastěji používané kombinace: **trojnožka (tripod scanner)**, **rubička (tube scanner)**, **kříž**. [1], [2], [25]

### 2.2.1.5. Elektrodynamické skenery

Piezelektrické skenery mají podstatné omezení a to velikost skenovací oblasti, která závisí na velikosti samotné piezokeramiky. Případné zvětšení by znamenalo prodražení konstrukce a problémy s rezonanční frekvencí. Pro některé aplikace je však velká skenovací oblast výhodná, i s případným obětováním rozlišení např. AFM biologických vzorků. Ty bývají na podložce rozprostřeny velmi nehomogenně a nanometrových rozlišení na nich běžně dosahováno nebývá. V takovém případě se může použít skener, jehož konstrukce se skládá ze čtyř cívek. Jejich středy jsou umístěny ve vrcholech čtverce a jsou překryty destičkou, na níž je připevněna tyčinka s hrotem. Dosahuje rozlišení asi 10 nm při velikosti skenovacího rozsahu 1,2 mm. [1]

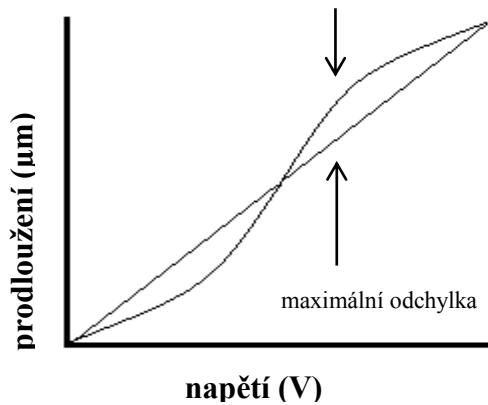
### 2.2.1.6. Nelinearity skeneru

#### *Vlastní (intrinsická) nelinearita*

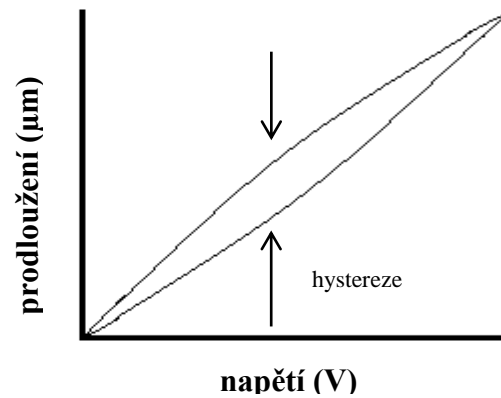
Tato chyba je způsobena přímo materiálem skeneru. Prodloužení či zkrácení není lineárně závislé na přiváděném napětí. Udává se poměrem maximální odchylky od lineární aproximace a příslušné hodnoty prodloužení. V rovině povrchu vzorku se efekt vlastní nelinearity projeví deformací (zkroucením) původně rovinné ekvidistantní mřížky měřících bodů. U členitých povrchů nemusí být odchylka od ideálního stavu viditelná. V grafu závislosti prodloužení na přiloženém napětí se vlastní nelinearita projeví jako křivka ve tvaru písmene S, jak je patrné z **Obr. 4a**.

#### *Hystereze*

Hystereze se projevuje vytvořením uzavřené smyčky v grafu závislosti prodloužení na přiloženém napětí **Obr. 4b**. Hystereze skeneru je charakterizována poměrem maximálního rozdílu mezi oběma větvemi smyčky a maximální hodnoty prodloužení. Vliv hystereze potlačujeme řádkovým skenováním vždy jen v jednom směru. Velikost hystereze můžeme určit proměřením v opačném směru, kdy je mezi obrazy znatelný posun ve směru skenování. Hystereze má rovněž nepříznivý vliv na určování výškových schodů.



**Obr. 4a Vlastní nelinearita skeneru**  
 Přímka znázorňuje ideální chování piezokeramiky, křivka reálný průběh. [1]



**Obr. 4b Hystereze skeneru**  
 Sestupná část křivky nekopíruje vzestupnou, je to důsledek hystereze keramického materiálu. [1]

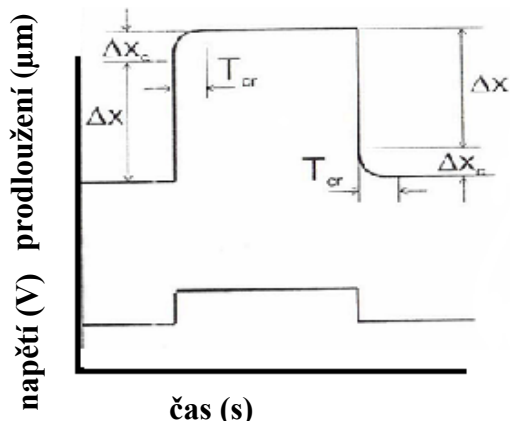
### Creep

Creep (tečení) je jev, který nastává při náhlém přiložení napětí. Krystal se nezačne roztahovat jako celek, ale po jednotlivých částech. Když dojde k nastavení skeneru na požadované místo, začne lokalizovaná poloha pozvolna ujíždět během homogenizace prodloužení v celém objemu piezokeramiky. Následkem tečení je rozdílnost obrazů nasnímaných při různých rychlostech skenování. Kvantitativně je creep charakterizován poměrem  $\Delta x_c / \Delta x$ , kde  $\Delta x$  je prodloužení, které nastane ihned po přiložení napěťového skoku a  $\Delta x_c$  je prodloužení, které teprve „doběhne“.  $T_{cr}$  se označuje čas, během kterého ke creepu dojde. Creep skeneru je zakreslen v grafu na **Obr. 4c**. Ve směru vertikálním se projevuje jednak zákmitem na prudkých sestupných a vzestupných stěnách, jednak vznikem různě sytých stínů na pozvolných stěnách. Nejvíce se projevuje při pomalém skenování.

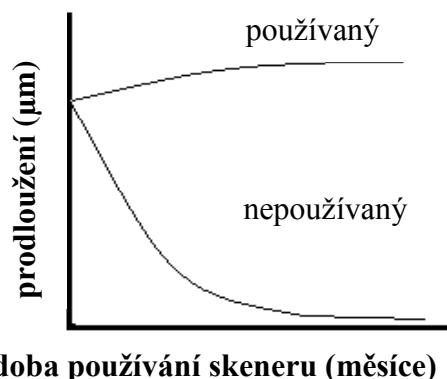
### Stárnutí skeneru

Stárnutí skeneru se projevuje změnou piezoelektrického koeficientu  $d$  v čase. Součástí procesu stárnutí jsou dva jevy. Pokud je skener užíván pravidelně, odchylky prodloužení pro daná napětí se pomalu zvyšují s dobou a frekvencí užívání. V době kdy skener není používán, se změna extenze skeneru snižuje exponenciálně. Z **Obr. 4d** vyplývá, že čím častěji (déle) je skener používán, tím většího rozsahu pohybu je schopen. Pokud analyzujeme povrch v AFM, délkové hodnoty v příčném i vertikálním směru vykazují jistou chybu, charakter objektů však zůstane nezměněn.





**Obr. 4c Creep skeneru**  
Průběh extenze s vyznačeným creepem v závislosti na napětí přiváděném na hrot. [1]



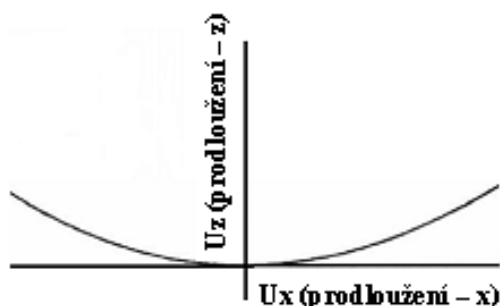
**Obr. 4d Stárnutí skeneru**  
Deformační koeficient  $d$  piezokeramiky se mění exponenciálně s časem a dobou používání. [1]

### Křížový efekt

Křížový efekt je charakterizován nežádoucím pohybem v určitém směru, je-li požadován pohyb ve směru jiném. Tento jev může být způsoben například elektrickým polem, které není přesně homogenní v objemu skeneru nebo geometrickým tvarem piezoelektrických prvků. Pohyb skeneru ve směru  $x - y$  je uskutečněn tehdy, pokud se jedna strana válce stahuje (kontrakce) a druhá napíná (extenze). Skener se ve skutečnosti nepohybuje v požadované rovině, ale po obloukové dráze, viz **Obr. 4e**.

### Drift

Pod pojmem drift rozumíme ujíždění hrotu vzhledem ke vzorku z různých příčin. Drift je patrný zvláště při malých rychlostech, protože narůstá doba, během níž se může projevit. Nejdůležitější složkou driftu je složka tepelná, která vzniká v důsledku rozdílností koeficientů teplotní roztažnosti jednotlivých konstrukčních částí mikroskopu nebo se jedná o vnitřní zdroj ohřevu (přechod proudu, osvětlení). Další složkou driftu je složka elektronická, která se projevuje změnou nastavení zesilovačů. [1]



**Obr. 4e Křížový pohyb skeneru**

Tendence skeneru pohybovat se v ose -  $x$  ( $y$ ) s falešnou  $z$  - složkou. [1]

## 2.2.2. HROTY A NOSNÍKY

Hrot (angl. tip) a nosník nebo raménko (angl. cantilever) jsou stěžejními částmi SPM mikroskopů. Jejich charakter se mění podle druhu mikroskopie.

### 2.2.2.1. Hroty pro STM

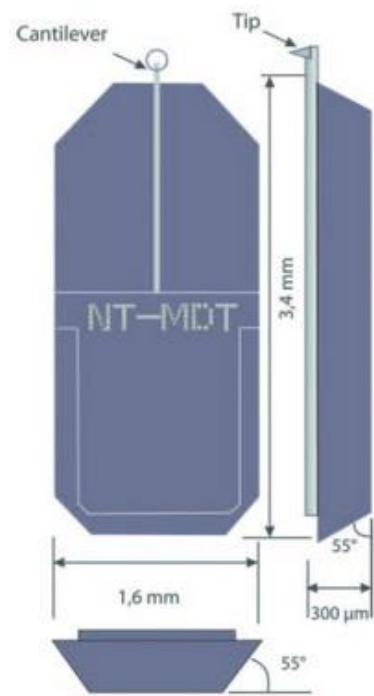
Pro dosažení nejpřesnějších výsledků měření by měl být hrot STM ostrý, vodivý a bez povrchových nečistot. Dříve se hroty vyráběly mechanicky (rozstřižený nebo přetržený drát) a dosahovalo se rozlišení asi 1 nm. Pro dosažení vyššího rozlišení se začaly používat hroty chemicky leptané. U hrotů záleží na chemické podstatě - přítomnost nekovových částic může způsobit nestability ve funkci zpětné vazby. Hrot by měl být v ideálním případě čistý, zakončený jedním atomem, dostatečně tuhý (tuhost má vliv na rychlost skenování) a s jednoduchou elektronovou strukturou.

Elektrochemickým leptáním, které je založeno na principu anodického rozpouštění wolframového drátu s použitím stejnosměrného či střídavého proudu v roztoku NaOH nebo KOH při napětí 13 V, se vyrábí **wolframové hroty**. Jsou dostatečně tuhé, ale vytváří se na nich oxidová vrstvička, která se musí odstranit. Vhodným materiálem pro výrobu hrotů je také platina. Je chemicky stálá ale nemá ideální mechanické vlastnosti, proto se vytvrzuje iridiem (**Pt – Ir hroty**). Další vhodné materiály k výrobě hrotů jsou např. molybden, nikl, monokrystal wolframu nebo zlato. Specifické hroty potažené izolantem (sklo, vosk) se používají v elektrochemii, kde se izolantem zabrání toku faradaických proudů mezi hrotem a vzorkem.

### 2.2.2.2. Hroty a cantilevery pro AFM

AFM sonda (angl. probe) se skládá zpravidla z ostrého hrotu a cantileveru, který svým ohybem indikuje velikost interakční síly. Dříve se sondy připravovaly mechanicky např. zahnutý wolframový drát nebo zlatý pásek s diamantovým hrotem. Dnes jsou hroty a nosníky připravované především litografickými technologiemi. Nemusí být vodivé ale vhodně upravené k detekci. Pro optickou detekci je třeba cantilever opatřit z horní strany odrazivou vrstvou kovu např. zlata. Tato vrstva způsobuje problém při změnách teploty, kdy dochází k nežádoucímu ohybu. Důvodem je rozdílná tepelná roztažnost materiálu nosníku a odrazivé vrstvy. Dnešní sondy mají podobu tzv. čipů (Obr. 5), které jsou stabilní a flexibilní pro různé vzorky (snadno se

vyměňují, mají standardní velikost, a proto jsou kompatibilní s většinou komerčních zařízení AFM). Jednotlivé režimy vyžadují specifický charakter sondy (pro dotykové režimy se používají pružná, pro bezdotykové naopak tvrdší raménka). Na cantilever jsou kladeny požadavky vysoké rezonanční frekvence a malé setrvačnosti. Rezanční frekvence je rozhodující faktor pro rychlou odezvu raménka v nekontaktních AFM režimech. Důležitou vlastností raménka je malá hmotnost a optimalizovaná tuhost. Tuhost raménka závisí na jeho tvaru, rozměrech a materiálu, ze kterého je vyrobeno. Po splnění těchto kritérií je senzor dostatečně citlivý i na malé síly. Velikost obrazu a křivost špičky hrotu jsou faktory určující příčné rozlišení AFM obrazu. Ostřejší hroty s poloměrem křivosti hrotu kolem 5nm poskytují příčné rozlišení 1 až 2 nm.



**Obr. 5** čip standardní velikosti[27]

Pro ploché povrchy stačí vyrobit obdélníkový cantilever bez hrotu, ten je nastavený pod úhlem tak, aby jeden z rohů byl nejbližší a sloužil jako hrot. Pro hrubší povrchy a pro požadavky většího rozlišení se vyrábí nosník s hrotem. Hroty a cantilevery pro AFM jsou nejčastěji vyráběny z křemíku nebo nitridu křemíku. Je mnoho postupů výroby těchto hrotů, většinou se jedná o proces odleptávání z křemíkové desky, nanášení vrstev sloučenin křemíku a následné litografické tvarování hrotů.

Hroty s pyramidální nebo tetraedrální geometrií jsou širší než kuželové. Vzhledem k jejich robustnosti jsou méně vhodné pro zobrazování hlubokých a ostrých povrchových struktur. Hroty tvaru kužele jsou pro taková měření vhodnější, ale jsou více náchylné ke zlomení. Křemík jako materiál je podstatně měkčí než nitrid, ale má výhodu v dobrých mechanických vlastnostech a lze ho dopovat různými příměsemi. Tloušťka křemíkových ramének může být menší než 1 μm, což přispívá ke zvýšení rezonanční frekvence. Nitrid křemíku je tvrdší materiál a hroty jsou trvanlivější. Může ale obsahovat zbytková pnutí a později se zdeformovat. Nitridová raménka nedosahují tak malé tloušťky jako křemíková. Některé technologie výroby hrotů jsou slučitelné pouze s oxidy křemíku (SiO<sub>2</sub>), ty mají větší vnitřní napětí a jsou křehčí než nitrid. Vzniklé hroty lze chemicky upravovat nanášením vrstev různých látek pro tzv. funkčně

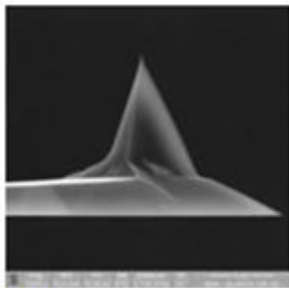
citlivé zobrazování, kde můžeme sledovat rozložení vybraných chemicky aktivních skupin.

Existují také speciální typy hrotů, kterým se říká „narostlé“. Výroba těchto hrotů spočívá v úplně odlišných technologiích. Rostou přímo na konci raménka a to např. usazováním částic v tubusu elektronového mikroskopu.

Tzv. „superhroty“ jsou hroty tvořené elektronovým svazkem ve skenovacím elektronovém mikroskopu na běžném pyramidálním hrotu pro AFM.

Ve snaze zmenšit poloměr křivosti hrotu je jednou z možností použití nanotrubiček. Jsou upevněné na klasický AFM hrot a je možné dosáhnout rozlišení až 0,5 nm. Výhodou je malá adheze ke vzorkům, přesně definovaná struktura a možnost modifikace konců trubiček chemickými i biologickými složkami.[1], [2], [28]

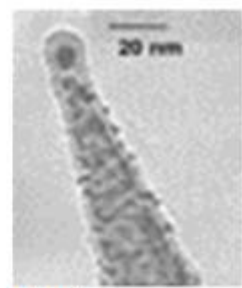
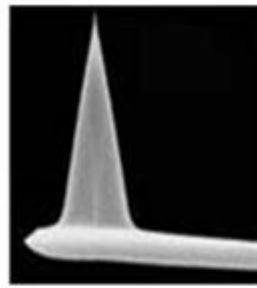
#### Přehled některých hrotů vyráběných ruskou firmou NT – MDT:



Obr. 6a



Obr. 6b



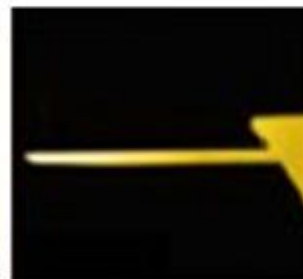
Obr. 6c



Obr. 6d



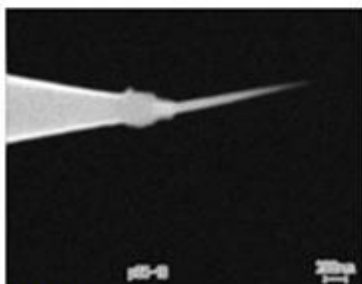
Obr. 6e



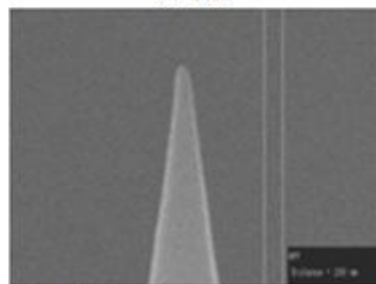
Obr. 6f



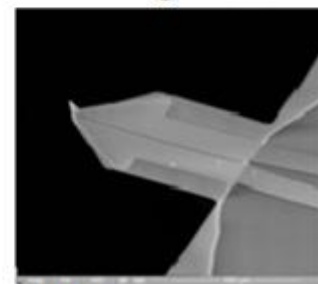
Obr. 6g



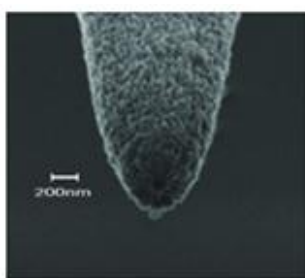
Obr. 6h



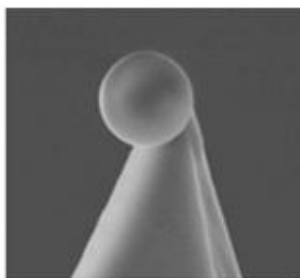
Obr. 6i



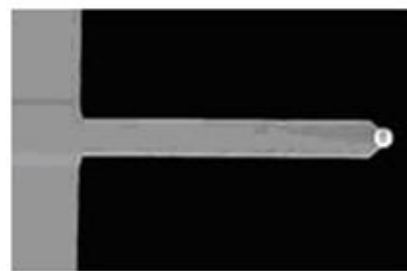
Obr. 6j



Obr. 6k



Obr. 6l



Obr. 6m

**Obr. 6a – m:** Sondy pro nekontaktní nebo semikontaktní režimy (**Obr. 6a**); Sondy pro kontaktní režim (**Obr. 6b**); Vodivé hroty (**Obr. 6c** sonda pro nekontaktní/semikontaktní režim); Magnetické sondy (**Obr. 6d** SEM fotografie hrotu MFM01 sondy s poloměrem zakřivení 35 nm); Sondy bez hrotu (**Obr. 6e** NSG20 tipless, **Obr. 6f** CSG11 tipless); Super ostré 1nm hroty (**Obr. 6g**); Sondy typu „Whisker“ (**Obr. 6h**); Sondy potažené diamantovou vrstvou (**Obr. 6i**) vhodné pro oxidační nanolitografii; Sondy pro termální mikroskopii SThM (**Obr. 6j**) tyto sondy jsou určeny pro zobrazování teploty a tepelné vodivosti na povrchu vzorku; Sondy pro mikroskopii v blízkém optickém poli (**Obr. 6k**); Koloidní sondy (**Obr. 6l** cantilever se submikronovou kulovitou částicí na křemíkovém hrotu, **Obr.6m** cantilever s mikronovou, kulovitou částicí, umístěnou na volném konci nosníku bez hrotu (tipless)); Všechny obrázky jsou dostupné z [28]

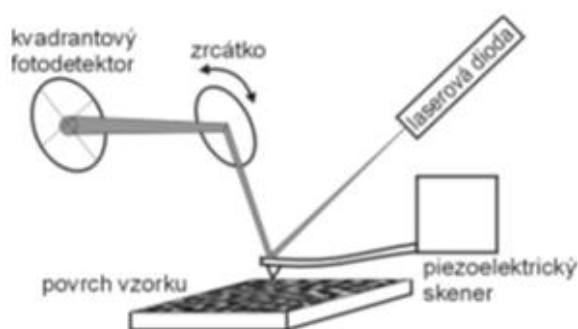
### 2.2.3. DETEKCE OHYBU CANTILEVERU

Vzájemné silové působení mezi hrotem a povrchem skenovaného vzorku je základem AFM signálu, způsobuje ohyb nosníku a míra ohybu je detekována. První AFM používaly k detekci ohybu nosníku tunelový proud (STM), nyní jsou však rozšířeny nejrůznější konstrukce především optických metod. Pro jednotlivé typy indikace je nutné mít odpovídajícím způsobem upravenou vrchní stranu cantileveru.

#### 2.2.3.1. Indikace laserem

Nejběžnější detektor ohybu nosníku je laserová dioda, schéma na Obr. 7. Laser je fokusován na vrchní stranu nosníku, který má vysokou odrazivost. Tato reflexní vrstva se potahuje různými vysoce odrazivými

materiály, nejčastěji chemicky stabilním zlatem. Odražené světlo dopadá na světelný detektor, který je zpravidla rozdělen na čtyři světlocitlivé části. Tento kvadrantový



Obr. 7 Schéma detekce laserem u AFM [1]

fotodetektor je schopný detekovat i pohyb v dalším směru a to zkrut raménka. Před začátkem měření se změří referenční hodnota osvětlení jednotlivých segmentů diody. Při měření se ohyb cantileveru projeví posunem odrazu a energie v jednotlivých částech segmentů nebudou stejné. Z tohoto posunu lze vypočítat ohnutí nosníku.

#### **2.2.3.2. Indikace změnou kapacity**

Při této mechanicko – elektronické detekci je na raménko připevněna kovová elektroda, která je pohyblivou částí kondenzátoru. S výchylkou cantileveru se mění vzdálenost mezi elektrodami a kapacita kondenzátoru. Zpětnovazební obvody pomocí piezokeramiky dorovnájí systém na konstantní kapacitu. Při této detekci je nutné aby vrchní strana nosníku byla vodivá, nejlépe pokovená.

#### **2.2.3.3. Indikace piezorezistivní**

V některých případech se používá detekce piezorezistivní. Raménko je tvořené přímo z piezomateriálu a při jeho ohnutí se mění odpor piezorezistoru, který se měří.

#### **2.2.3.4. Indikace pomocí STM**

Princip této indikace je založen na tunelovém jevu. Cantilever je na vrchní straně pokryt vodivou vrstvou a ta slouží jako vzorek pro STM. Vodivá vrstva a raménko STM slouží jako dvě elektrody a velikost tunelového proudu je pak nepřímo úměrná vzdálenosti mezi nimi. Nevýhodou je náročnost provedení (dvě zpětné vazby) a nižší citlivost. Naopak výhodou je mechanická stabilita a nízké teplotní driftы.

#### **2.2.3.5. Indikace polarizovaným světlem**

Další optickou metodou je detekce diferenciálním interferometrem. Dva svazky vzájemně kolmé polarizace referenční a měřicí dopadají na vrchní stranu nosníku a odrážejí se od ní. Měřicí paprsek dosahuje blízko hrotu a referenční v místě, kde je nosník připevněn. Po prohnutí raménka oba svazky urazí rozdílnou dráhu a to se projeví na interferenci. Výchylka cantileveru se měří jako fázový rozdíl mezi měřicím a referenčním paprskem. Oba svazky podstupují stejné změny a proto je minimalizována nestabilita zdroje i narušení optické dráhy. [1], [2], [26]

## 2.3. SKENOVACÍ TUNELOVACÍ MIKROSKOPIE - STM

Metoda STM (angl. Scanning Tunneling Microscopy, 1981) využívá k měření vzorků rastrovací tunelovací mikroskop, mikroskop, který umožňuje dotýkat se atomů. Lze ho přirovnat ke gramofonu, kdy jehla tažená nad povrchem mění svou vertikální polohu v závislosti na morfologii desky. V tunelovací mikroskopii měříme proud mezi ostrým hrotem, zpravidla zakončeným jedním atomem, a vodivým vzorkem. Mezi hrotem umístěným do vzdálenosti 1 nm od povrchu a vodivým vzorkem jsou elektrony „tunelovány“ aniž by byli v přímém mechanickém styku. Výsledný tunelový proud závisí na vzdálenosti hrotu a vzorku a je nositelem signálu, který se podílí na vzniku STM obrazu. Rastrovací tunelová mikroskopie lze použít pro studium vodivých povrchů nebo nevodivých tenkých filmů uložených na vodivých podkladech.

### 2.3.1. TUNELOVÝ JEV

K tunelovému jevu dochází v případě, kdy mezi dvěma vodivými pevnými látkami vznikne energetická bariéra, kterou elektrony podle klasické teorie nemohou proniknout. V kvantové fyzice, kde je částice popisována vlnovou funkcí, tato funkce exponenciálně klesá. Pravděpodobnost průchodu není nulová a zratelných hodnot nabývá teprve pro velmi úzké bariéry. Pravděpodobnost přechodu částic přes bariéru se dá vyjádřit po zjištění potenciální energie (tvar bariéry), energie a hmotnosti částice a šířky bariéry. Zjednodušeně lze tento vztah nahradit součinem efektivní výšky a šířky bariéry. S narůstající šířkou bariéry pravděpodobnost přechodu exponenciálně klesá.[1], [2], [4]

### 2.3.2. VLASTNÍ MĚŘENÍ

Hrubý posuv ve směru kolmém ke vzorku lze provést mechanicky. Po přiložení napětí mezi vodivý hrot a vzorek dojde k průchodu tunelového proudu. Pomocí piezokeramiky se provádí jemný posuv vzorku ke hrotu popř. hrotu ke vzorku tak, aby byl proud měřitelný. Tunelové proudy registrované v průběhu měření jsou malé - až 0,03 nA, takže je možné zkoumat i nízkou vodivost povrchů, zejména biologických objektů. Výstupem měření je matice s indexem označujícím polohu bodu a příslušnou hodnotu měronosného signálu. V závislosti na druhu režimu měření (režim s konstantní výškou nebo konstantním proudem) může být tento signál dvojího druhu. [2], [4]

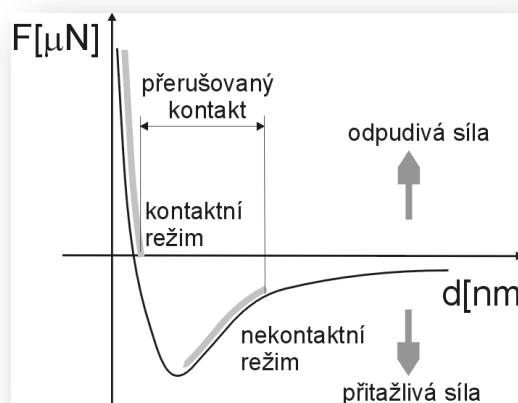
## 2.4. MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL - AFM

I přes velký úspěch rastrovací tunelové mikroskopie bylo zřejmé, že STM má zásadní nevýhodu, a to měřit vzorky pouze vodivé nebo velmi tenké vrstvy na vodivém podkladu. Tato nevýhoda byla překonána vynálezem mikroskopu atomárních sil. Vznikla nová metoda SPM technik - Mikroskopie atomárních sil (angl. Atomic Force Microscopy, 1986). G. K. Binnig byl první, kdo předpokládal, že se díky interakci mezi povrchem vzorku a cantileverem s ostrou špičkou, může tento nosník ohýbat, a to v závislosti na velikosti a charakteru působících atomárních sil.

V současné době se využívá sonda, která skenuje povrch vzorku ostrým hrotem. Hrot s průměrem špičky kolem 10 nm je umístěn na volném konci cantileveru o délce 100 až 200  $\mu\text{m}$ . Vzájemná interakce hrotu a povrchu vzorku způsobuje ohyb raménka, který je zpravidla detekován laserem (kapitola 2.2.3.1.). Laserový paprsek dopadá na vrchní vysoce odrazivou stranu cantileveru a následně se odráží na fotodiodový detektor. Ten vyhodnocuje změny odraženého svazku a vytváří měronosnou veličinu, prostřednictvím které počítač vygeneruje topografii povrchu vzorku s atomovým rozlišením. [1], [2], [25], [22]

### 2.4.1. SÍLY PŮSOBÍCÍ V AFM

Síly ohýbající raménko mohou být různé fyzikální podstaty a orientace. Výsledná síla může být odpudivá nebo přitažlivá v závislosti na vzdálenosti hrotu od povrchu vzorku. Pro korektní vyšetřování sil nestačí znát pouze interakce mezi dvěma molekulami ale interakci mezi tělesy (vícečásticové interakce, vliv prostředí – permitivita, vazba mezi hrotem a vzorkem, vznikající třecí, deformační nebo kapilární síly atd.).



**Obr. 8 Silová křivka** - závislost meziatomových sil  $F$  na vzdálenosti hrotu od povrchu vzorku  $d$ . [1]

#### 2.4.1.1. Van der Waalsovy síly

Přiblížíme-li k sobě dva atomy na velmi malou vzdálenost (desítky nanometrů), začne mezi nimi působit přitažlivá van der Waalsova síla, která obecně



působí mezi dvěma libovolnými atomy bez ohledu na jejich chemickou podstatu či vazbu v látce. Síla v přítomnosti více atomů není dána součtem párových interakcí. Pro její teoretické výpočty byla zavedena tzv. Hamakerova konstanta, jež zahrnuje charakteristiky obou materiálů (hrotu i vzorku).

#### **2.4.1.2. Síly krátkého dosahu**

Po velmi těsném přiblížení (subnanometrová vzdálenost) však začnou působit na atomy další síly, tentokrát odpudivé, které jsou způsobeny překryvem elektronových obalů obou atomů. Tyto síly krátkého dosahu vyplývají především z Pauliho principu, je-li vzájemná vzdálenost menší než součet atomových poloměrů. Silové působení probíhá také při vzniku vazby mezi hrotem a vzorkem, tzv. chemisorpce. Při přiblížení dvou kovů dochází k přesunu elektronů a vzniku přitažlivé síly – kovová adheze. Odpudivé coulombovské síly vznikají při těsném přiblížení hrotu ke vzorku, když náboje jader nejsou zcela vyrovnány. [1], [26]

#### **2.4.1.3. Kapilární síly**

Kapilární síly jsou způsobené kondenzací vodní vrstvy na povrchu vzorku, kde tato vodní vrstva vytváří meniskus kolem AFM hrotu (při jeho těsném přiblížení k povrchu) a prostřednictvím kapilárních sil jej přitahuje k povrchu vzorku. Pro snížení efektu kapilárních sil, a tím i zvýšení rozlišení AFM snímků, bylo vyvinuto několik experimentálních přístupů. Jedním z nich je preferování EBD hrotů (electron beam deposited „supertips“), které jsou více hydrofobní než klasické nemodifikované  $\text{Si}_3\text{N}_4$  hroty. [6]

### **2.4.2. REŽIMY AFM**

#### **2.4.2.1. Dotykový režim – Contact mode (C-AFM)**

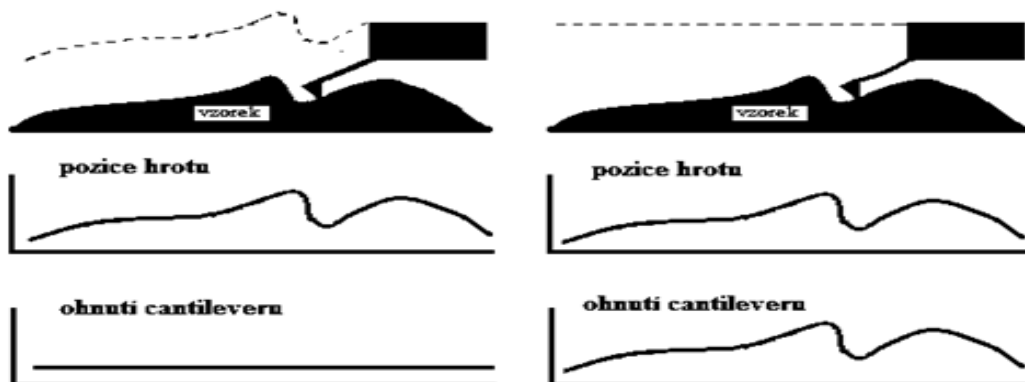
Kontaktní (dotykový, repulzivní) režim je nejstarším módem, při kterém se hrot pohybuje přímo v mechanickém kontaktu se vzorkem. Na hrot v těsné blízkosti povrchu působí zejména tři hlavní síly.

Odpudivé síly, vznikající na základě Pauliho vylučovacího principu (rozsah těchto sil  $10^{-10}$ - $10^{-8}$ N), který brání tomu, aby elektrony atomů hrotu měly stejnou vlnovou funkci jako elektrony příslušné atomům vzorku. Přitažlivé van der Waalsovy

síly, které mají charakter dipól-dipólové interakce (rozsah sil je  $10^{-8}$ - $10^{-7}$ N). Pružná síla nosníku udržující hrot v kontaktu s povrchem je závislá na míře ohybu a konstantě tuhosti nosníku (rozsah sil je  $10^{-9}$ - $10^{-8}$ N). Kromě těchto hlavních tří působících sil vznikají v průběhu kontaktního režimu AFM vlivem povrchového napětí také síly kapilární. Výsledná síla působící na hrot je odpudivá (Obr. 8). Topografický profil u C-AFM může být generován dvěma různými způsoby:

#### 2.4.2.1.1. Dotykový režim s konstantní výškou

V módu konstantní výšky přechází piezokeramický skener s hrotem po povrchu v konstantní výšce a tím na něho působí v různých místech různě velké síly. Ohnutí nosníku je pak důsledkem těchto interakcí mezi povrchem vzorku a hrotem a tato hodnota dává vzniknout topografické informaci. Cantilever je malý a rychle reaguje na změny sil. Měření je proto velmi rychlé ale se sníženou přesností měření. Rozdíl výšek na povrchu vzorku by neměl být příliš velký, nosník by se mohl zlomit. Video ukázka [30].



**Obr. 9a** Kontaktní režim s konstantní silou  
Převzato a upraveno [29]

**Obr. 9b** Kontaktní režim s konstantní výškou  
Převzato a upraveno [30]

#### 2.4.2.1.2. Dotykový režim s konstantní silou

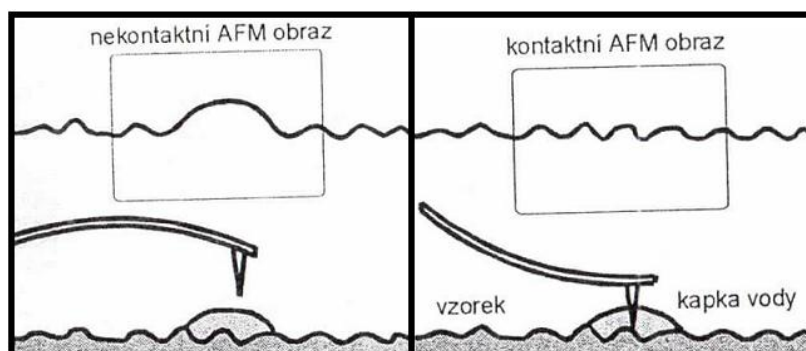
V módu konstantní síly jsou nevýhody odstraněny tím, že je hrot ke vzorku přitlačen tak, aby ohnutí nosníku bylo konstantní po celou dobu skenování. Potom je konstantní i síla působící na nosník, a tak se vyvarujeme závislosti prohnutí cantileveru na kapilárních silách a pružnosti raménka. V tomto režimu je měření pomalejší, protože je pohybováno hrotem nahoru a dolů a systém je omezován odezvou zpětné vazby. Kontaktní režim je schopen dosáhnout v případě tvrdých vzorků atomárního rozlišení.

U měkkých vzorků je rozlišení získaných snímků horší, vlivem laterálních sil generovaných bočním pohybem hrotu. Tyto síly umožňují hrotu se vzorkem hýbat, deformovat jej či úplně zničit. Proto nebývá tento režim v současnosti při biologických aplikacích používán. [2], [25], [26], video ukázka [29]

#### 2.4.2.2. Bezdotykový režim – Noncontact mode (NC-AFM)

V nekontaktním režimu (NC-AFM, video ukázka [31]) je hrot udržován ve vzdálenosti cca 5 až 15 nm nad povrchem vzorku a k zobrazování jsou využity přitažlivé síly (Obr. 8), které ohýbají nosník směrem k povrchu vzorku. Protože zde není hrot v mechanickém kontaktu se vzorkem, nedochází k poškození vzorku. Větší vzdálenost hrotu od vzorku znamená menší hodnotu působící síly, což vede k menšímu ohnutí nosníku a tedy menší citlivosti systému a větší náchylnosti na šum. Aby byl zvýšen odstup signálu od šumu, je používána oscilační metoda. Volný konec nosníku kmitá poblíž hodnoty rezonanční frekvence. Detekovány jsou změny v rezonanční frekvenci nebo amplitudě kmitů volného konce nosníku při přibližování a oddalování hrotu od povrchu.

Vlivem velkého počtu atomů vstupujících do interakce však nelze očekávat dosažení velkého rozlišení. Metoda je vhodná k měření drsných povrchů nebo biologických (měkkých) vzorků. Nevýhodou této metody je opět citlivost na vrstvičku vody, která se vždy vytváří kondenzací vzdušné vlhkosti. Tato vrstvička vyvíjí na hrot kapilární sílu, která může být značná. Hrot bývá v této vrstvě obvykle zachycen, čímž přestane kmitat a skenovaný obraz je ztracen.



**Obr. 10** Vznik topografie povrchu se z kondenzovanou vodou u kontaktního a nekotaktního režimu AFM [1]

V módu konstantní výšky je vertikální poloha nosníku fixována a je měřena změna amplitudy kmitů při pohybu nosníku podél vzorku. V místech, kde je na povrchu

vyvýšenina, bude působící síla větší, a výsledná amplituda bude menší. Záznam dat v každém bodě rastru má podobu  $x, y, A$ .  $A$  je velikost amplitudy v daném bodě.

**Mód konstantní amplitudy**, kde je udržována konstantní amplituda kmitání, pomocí svislého pohybu nosníku ve směru osy  $z$ . K sestavení topografie vzorku je použita trojice dat  $(x, y, \Delta z)$ , kde všechny veličiny mají rozměr délky. [2], [25], [26]

#### 2.4.2.3. Poklepový režim – Tapping mode (Semicontact mode)

Mezi poklepovým a nekontaktním režimem není přesně daná hranice a často se prolínají. Důvodem vzniku tohoto režimu je překonání pracovních problémů při zobrazování v nekontaktním režimu a zároveň minimalizace laterálních sil mezi vzorkem a hrotem, které ztěžují skenování v kontaktním režimu. Rozkmit je tak velký, že občas dojde ke kontaktu hrotu s povrchem. Oscilační amplituda je v TP-AFM volena v rozsahu 20-100 nm, je mnohem větší než v nekontaktním režimu. Odstranění problémů s kondenzací vody je dosaženo právě tím, že je značně zvýšena amplituda kmitů. Nosník má pak dostatek energie k uvolnění se z dosahu kapilárních sil. Litografie povrchu se vytváří opět z detekce změny rezonanční frekvence. [2], [26], video ukázka [32]

### 2.5. Odvozené techniky SPM doplňkové k AFM

Metoda AFM nachází během několika posledních let stále širší spektrum uplatnění (elektronika, polovodičové materiály, polymery a také biologie). Nejznámější aplikací AFM je **získávání topografických informací** zobrazovaného vzorku v několika možných režimech uzpůsobených charakteru vzorku.

Další aplikací, která stojí za zmínku je **Mikroskopie laterálních sil** (Lateral Force Microscopy – LFM). Tyto síly vznikají při měření v kontaktním režimu a vyplývají z nehomogenit povrchu, nejčastěji jde o změnu koeficientu tření nebo také při stupňovitých nerovnostech na povrchu vzorku. LFM detektor registruje zkrut raménka taženého po povrchu vzorku o daný úhel, tím získáváme informace o mechanických vlastnostech povrchu vzorku a také o bočních nerovnostech. [25], [19]

Významnou aplikací je **Mikroskopie detekce fázových posunů** (Phase Detection Microscopy – PDM). PDM je další technika, která se využívá pro mapování vlastností povrchu. Je použitelná s jakoukoliv vibrační technikou a spočívá

v registrování změn ve fázovém zpoždění mezi budícím a detekovaným signálem. Je možné detekovat změny v elasticitě, tření nebo adhezi na povrchu vzorku. Detekce fáze je využita při získávání informací o materiálových vlastnostech vzorků, jejichž topografie se snadněji měří v poklepovém režimu. [1], [2]

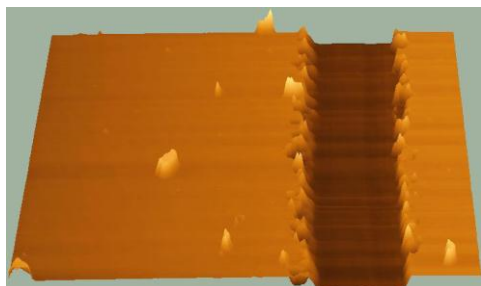
Mikroskopii atomárních sil chybí chemická citlivost, schopnost rozlišovat určité prvky či sloučeniny, byla vyvinuta **metoda funkčního mapování**. Ta je založena na možnosti nanést na hrot vhodnou chemickou látku. Při skenování pak může dojít v určitých oblastech vzorku k silnější chemické interakci, než by došlo v případě čistě topografického skenování. Takovým způsobem lze mapovat rozložení určitých chemických skupin na povrchu vzorku. U biologických aplikací lze tímto způsobem sledovat například rozložení receptorů. [26], [19]

## 2.6. APLIKACE AFM

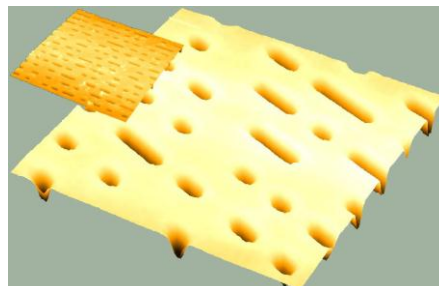
Metoda AFM se používá v různých odvětvích od materiálového inženýrství přes fyziku až k biologii a komunita jeho uživatelů se každoročně rozrůstá. Aplikace AFM není omezena pouze na mapování topografie vzorků, není tedy jen další zobrazovací technikou. Používá se též pro lokální silová měření, pro analýzu lokálních mechanických vlastností vzorků, dokonce lze AFM použít jako mikromanipulátor pro práci s jednotlivými molekulami.

### 2.6.1. ANALÝZA POVRCHŮ

Mikroskopy atomárních sil jsou schopny analýzy povrchů vodivých i nevodivých pevných látek. Často se využívají k měření tloušťky tenké vrstvy na povrchu materiálů (stopy digitálního záznamu na CD, laserové povlakování materiálů).



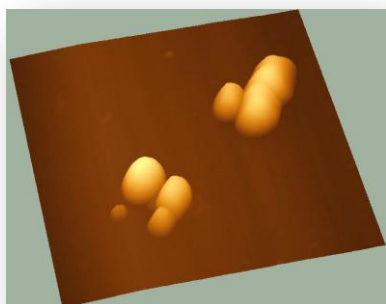
**Obr. 11** Vrstva  $\text{SiO}_2$  napařená na skle. Zobrazena rýha, sloužící ke stanovení tloušťky vrstvy (asi 180 nm), AFM [2]



**Obr. 12** Stopy na CD, prohlubně mají šířku asi  $0,5 \mu\text{m}$  a hloubku 100 nm. Skenovací okno  $5 \mu\text{m}$ , metoda AFM [2]

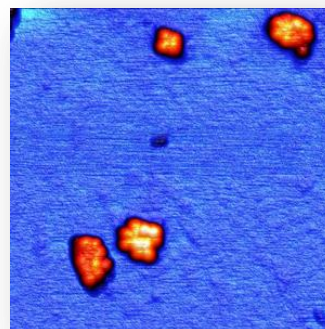
## 2.6.2. ANALÝZA NANOČÁSTIC

Nanočástice jsou popisovány jako objekty hmoty, které se měří v nanometrech, v řádu  $10^{-7}$  až  $10^{-9}$  m. V dnešní době jsou nanotechnologie asi jedním z nejvíce se rozvíjejících a nejvíce zkoumaných odvětví. I AFM mikroskopie je schopná analýzy částic nanometrových rozměrů. Na Obr. 13 jsou zobrazeny shluky feritinu na čerstvě sloupnuté slídě, měřené semikontaktním režimem na vzduchu. Velikost skenu je 380x380 nm. Na Obr. 14 je zobrazena důležitá sloučenina, nacházející uplatnění v řadě oblastí vědy a průmyslu. Jedná se o oxid železitý  $Fe_2O_3$ , tato nanočástice je uchycena na

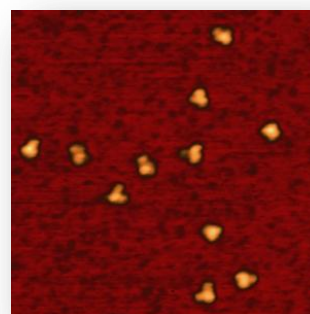


*Obr. 14 AFM sken nanočástice  $Fe_2O_3$  na slídě [2]*

slídě a okno skenu je 1  $\mu$ m.



*Obr. 13 AFM sken shluků feritinu, měřeno v semikontaktním režimu [39]*



*Obr. 15 AFM sken monoklonální antigen 1RK2 k A-řetězci ricinu (IgG1), skenováno v semikontaktním režimu na vzduchu, velikost skenu 60x60x2 nm [37]*

## 2.6.3. NEZOBRAZUJÍCÍ TECHNIKA

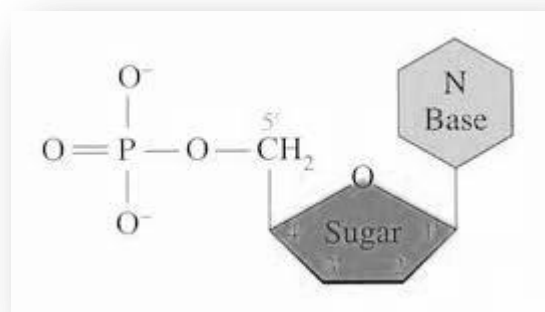
Kromě získávání topografických dat vzorku je metoda AFM využívána k měření sil například síly intermolekulární a intramolekulární nebo se odhaduje tvrdost povrchu. O této problematice hovoří i metoda funkčního mapování (kapitola 2.5.). Je třeba hrot upravit, nanést na něho látku (molekuly), která se bude chovat jako ligand. Povrch obsahuje receptory, které se s ligandy při přiblížení navážou a utvoří vazbu. Při oddalování se v určitou dobu vazba přeruší, což se projeví odskokem na silové křivce.

Schopnost AFM měřit síly v nanonewtonovém rozsahu za fyziologických podmínek je využívána v mnoha biologických aplikacích, jako jsou například biomembránové vazebné interakce. Dnes je jednou z nejstudovanějších interakcí síla mezi stavebními prvky DNA. Dále studium proteinů ale také mapování funkčních skupin na povrchu organických látek. AFM se také využívá při mapování elasticity.

Zobrazují se změny ve složení u směsných materiálů nebo se detekuje přítomnost kontaminace. Sonda AFM může detekovat molekulární a buněčný pohyb. Detekována byla aktivita molekul lysosomu, pohyb ureázy, mikrotubulů, aktivita draslíkových kanálů a mnohé další.[26]

## 2.6.4. BIOLOGICKÉ APLIKACE

Metoda AFM přitahuje pozornost biologů, protože kombinuje dva nejdůležitější aspekty pro studium struktury a funkce biologických vztahů objektů. Vysoké rozlišení s vysokým odstupem signálu od šumu v molekulárním (submolekulárním) rozsahu a schopnost pracovat ve vodném prostředí (zejména fyziologické pufrů), umožňující sledování dynamických dějů v reálném čase za fyziologických podmínek. Kromě zobrazování je metoda AFM používána také k manipulacím s membránami a molekulami, jsou měřeny různé lokální fyzikální nebo biofyzikální vlastnosti povrchů. V kontaktním režimu lze AFM použít k analýze tvrdých tkání např. kostí nebo zubů. Ke studiu měkkých vzorků je vhodnější nekontaktní režim.[18]



*Obr. 16 Nukleotid [16]*

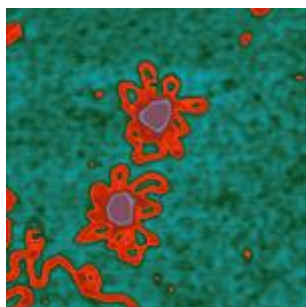
### 2.6.4.1. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou biomakromolekuly účastnící se přenosu genetické informace. Deoxyribonukleová kyselina, DNA, nese ve své struktuře genetickou informaci všech živých organismů. Její konformační chování může ovlivnit důležité biologické procesy, jako je například exprese genu či interakce s proteiny. Proto je porozumění konformačním změnám nukleových kyselin jeden z velmi důležitých cílů molekulární biologie. Molekuly DNA patřily mezi první studované objekty v AFM.

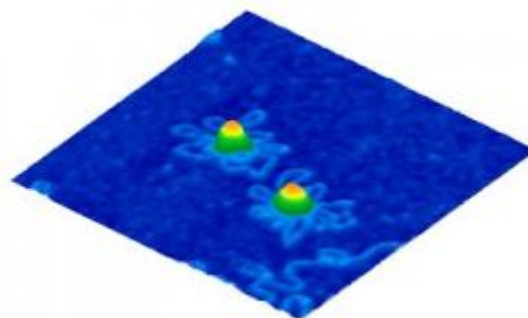
Dle místa výskytu rozlišujeme DNA: nDNA-jaderná, mtDNA-mitochondriální, ctDNA-chloroplastová, pDNA-plazmidová, recDNA-rekombinantní, rDNA-ribosomální. DNA je v podstatě makromolekulární látka skládající se z podjednotek zvaných **nukleotidy** (Obr. 16). Jednotlivé nukleotidy se skládají z **fosfátu** (zbytek

kyseliny fosforečné), **deoxyribózy** (pentóza = pěti uhlíkatý cukr) a **báze** (dusíkatá heterocyklická sloučenina). Báze v DNA se dělí dle struktury na pyrimidinové (Cytosin, Thymin, Uracil je analogem thyminu u RNA) a purinové (Adenin, Guanin). [11]

V roce 1992 nastal skutečný rozvoj v AFM zobrazování nukleových kyselin. Byly vyzkoušeny různé metodické postupy k uchycení molekul DNA. Nejprve byly vzorky zobrazovány spíše ve vzduchu při různé relativní vlhkosti, postupně se přešlo na AFM zobrazování v organických rozpouštědlech a v pufových roztocích. Snaha byla zvýšit adsorpci nukleových molekul k substrátu a získat reprodukovatelnost snímků. Velkým přínosem pro AFM zobrazování bylo vyvinutí TP-AFM režimu, který umožňuje zobrazovat i vzorky slabě uchycené k substrátu. Dnes jsou vyvíjeny metody specifické adheze DNA tak, aby křehká struktura komplexů DNA s proteiny nebyla poškozena během svého usazování na povrch substrátu.

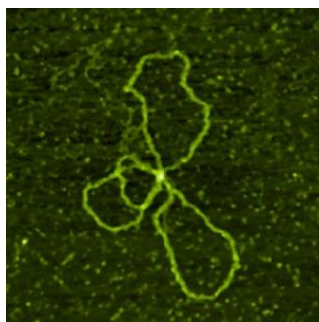


**Obr. 17a**

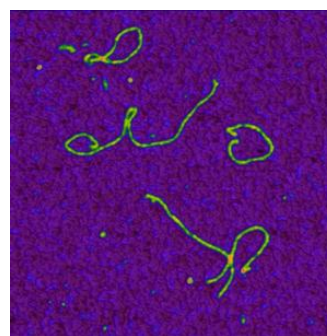


**Obr. 17b**

*Na obrázku 17a je 2D obraz pořízený v semikontaktním režimu na vzduchu. Na obrázku 17b je stejný sken v 3D zobrazení, velikost skenovaného okna je 290x290x6 nm. Zkondenzovaná DNA ve tvaru květiny na upravené slídě (poly-L-lysinem). [35]*



**Obr. 18**



**Obr. 19**

***Obr. 18** zobrazuje kruhovou plazmidovou DNA, svinutou do tvaru osmičky. Skenování proběhlo v semikontaktním režimu v ethanolu. Velikost skenovacího okna je 310x310x3,5 nm. [36]*

***Obr. 19** nativní kolagen z králičí kůže, skenováno v semikontaktním režimu na vzduchu, velikost skenovaného okna je 625x625x1,6 nm [40]*



V dnešní době je mnoho aplikací pro studium nukleových kyselin, uvedeny jsou alespoň některé z nich. AFM topografické snímky DNA s vysokým rozlišením. Studium změn v sekundární struktuře DNA (nadšroubovicové vinutí, kondenzace DNA). Zjistilo se, že při měření v roztoku o velké iontové síle molekuly DNA vykazují formování nejčastěji do tvaru osmičky. V pufru o nízké iontové síle je molekula převážně v relaxačním stavu. Jedna z nejznámějších aplikací AFM je zobrazování DNA-proteinových komplexů. O problematice protein-DNA komplexech psal především Bustamante a Rivetti (1996). Vědci z laboratoře IBM vyvíjejí senzory k identifikaci genových mutací – výroba DNA biosenzorů. Jde o specifickou interakci mezi DNA vlákny imobilizovanými na nosníku a DNA rozptýlenou v roztoku. Studium dynamických jevů DNA se zabývá např. procesem navázání a vyvázání specifických proteinů nebo dynamika polymerázového komplexu na různých fragmentech DNA. Dále můžeme vyšetřovat elasticitu a tuhost DNA nebo izolovat jednotlivé části nukleové kyseliny z vlákna DNA. [26]

#### **2.6.4.2. Proteiny**

Protein je makromolekula složená z jednoho nebo více polypeptidových řetězců. Polypeptidy se skládají z řetězců aminokyselin spojených do lineárního sledu peptidovými vazbami. Uspořádání aminokyselin v polypeptidu určuje primární strukturu. Sekundární strukturou se rozumí uspořádání řetězců do  $\alpha$ -helixu nebo  $\beta$ -skládaného listu. Nejčastěji zobrazované a zkoumané proteiny jsou kolagenové molekuly (Obr. 19, nativní kolagen z králičí kůže), lysozomy, ferritin, protilátky, proteáza, albumin, globuliny IgG, myosin, aktin, fibrinogen a další. Nejčastěji se skenují na vzduchu nebo ve vodném prostředí. Navázání k povrchu substrátu ale není jednoduché. Nejčastěji se používá zlato, na které se proteiny připoutají thiolovými skupinami. [1], [9]

#### **2.6.4.3. Biopolymery**

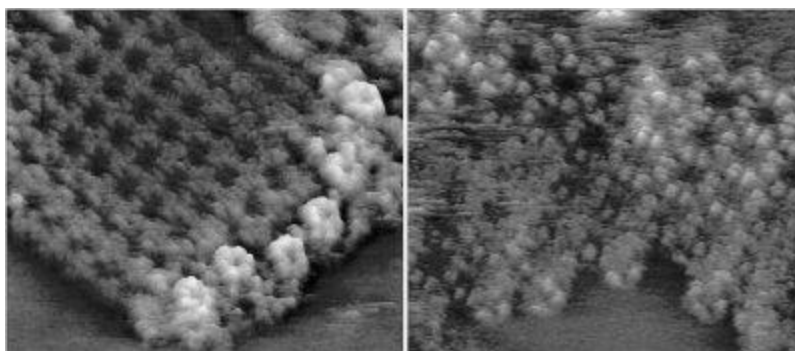
Významnou studií je pozorování tvorby biopolymerů v reálném čase. Nechávací se růst v kapalném prostředí uvnitř mikroskopu a jejich strukturální rozdíly se skenují v určitých intervalech. Je nutné dbát na čistotu hrotu při každém měření a zabránit tak vzniku kontaminace. Nejčastěji jsou studována vlákna kolagenu (obr. 19), (studie patologie pojivových a kostních tkání, cévního systému, kůže, zubů). Dalším častým

předmětem získávání informací jsou  $\beta$  amyloidní proteiny spojované s Alzheimerovou chorobou. [1], [9]

#### 2.6.4.4. Membrány

Přestože je známo mnoho o struktuře a funkci jednotlivých složek buněčných membrán, mnoho těchto informací je dostupných pouze z nepřímých pozorování. Prostřednictvím NC-AFM je možno však měřit topografii, povrchové síly a mechanické vlastnosti membránových povrchů v nanometrovém rozlišení.

Je možné izolovat a následně skenovat jaderné i buněčné membrány např. na slídě. Na cytoplasmatické straně membrány může být vidět vláknitá struktura aktinu, proteiny a póry. Je možné hodnotit vliv určitých látek (léků, iontů, hormonů nebo záření) na tyto membránové struktury. Dají se také pozorovat elektrické nebo transportní membránové děje. [1], [9]

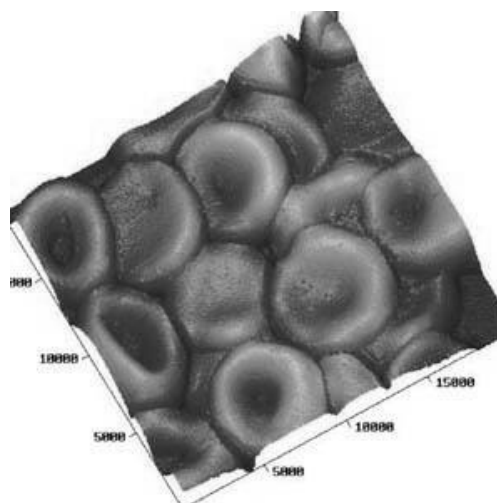


**Obr. 20** zobrazuje vnitřní strukturu transmembránových kanálů v membráně buňky čočky. Vlevo jde o buňky zdravé ovce a vpravo o lidskou buňku postiženou šedým zákalem. Ve fyziologickém stavu tvoří membrána typickou mřížku a proteiny o průměru 6nm jsou uspořádány do tvaru křížů. Tato mřížka je lemována proteiny o poloměru 8nm uspořádaných do tvaru květu. V patologickém stavu toto lemování chybí a mřížka není pravidelná. [15]

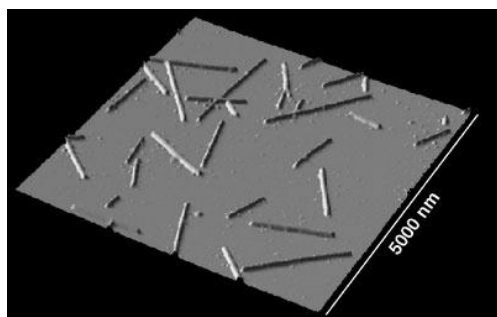
#### 2.6.4.5. Buňky

Skenování struktury buněk uchycených k substrátu vysušením a následným fixováním ztrácí možnost podávat informace o jejich chování v přirozeném stavu. Proto se často volí prostředí vodné. Buňky se musí vázat na vhodný substrát a přidáním kolagenu nebo třeba lamininu se adheze ještě podpoří. Další způsob adheze na substrát je uchycování buněk v pórech celulózového filtru. Často zobrazované jsou topografie erytrocytů (Obr. 21), zobrazení virů nebo jednobuněčných mikroorganismů.

**Problematika zobrazování virů metodou AFM.** Viry dělíme podle jejich hostitelů na bakteriální, živočišné a rostlinné. Bakteriální viry tzv. bakteriofágové se skládají ze tří částí hlavičky, bičíku a bičíkových vláken. Hlavička je tvořena nukleovou kyselinou (DNA/RNA) a tzv. kapsidou (bílkovinný obal). Jednotlivé kapsidové (coat) proteiny jsou uspořádány do větších útvarů známých jako kapsomery. Kapsida je tedy tvořena jednotlivými kapsomery. Bičík má vlivem kontraktilních bílkovin podobné vlastnosti jako sval (schopnost stahů).



*Obr. 21 AFM sken suspenze erytrocytů Makaka, zobrazeno v přerušovaném kontaktním režimu. Krvinky se deformují navzájem. Převzato a upraveno z [38]*

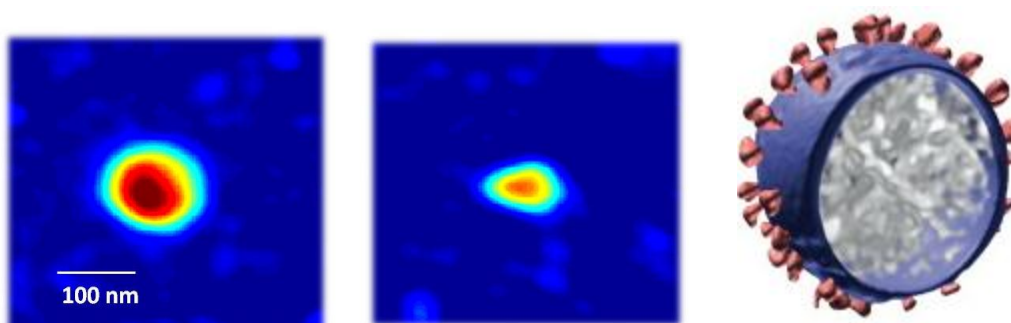


*Obr. 22 Virus tabákové mozaiky [5]*

Živočišné viry jsou strukturou jednodušší než bakteriální, ale po chemické stránce jsou stejné. Velikosti virů se velice liší. Průměr částice se pohybuje od 16 nm až po 750 nm. Zatímco nejmenší virion se dá přirovnat k velikosti ribozomu, ty největší připomínají velikost nejmenší bakterie. [7]

První dvě metody objasňující podrobné struktury virů, metody, které vedly k současné stavbě virů s ikosaedrální nebo helikální kapsidou, byly elektronová mikroskopie (EM) a rentgenová strukturní analýza. První vizualizace virové částice (bakteriofága) SPM metodou byla provedena pomocí skenovacího tunelového mikroskopu. Částice byla pokryta kovovou vrstvou tak, aby byla elektricky vodivá. S vynálezem AFM mikroskopie však přišly nové možnosti. Není podmínkou, aby byl vzorek vodivý. Lze provádění měření v tekutém prostředí, aniž by se narušil fyziologického stav vzorku. Není třeba barvení vzorku ani případné sušení. Pomocí AFM se dají určit přesné rozměry virů, topografie povrchu i jejich vnitřní struktura. Jako kalibrační vzorek se používá virus tabákové mozaiky (Obr. 22), jehož velikost je stálá. [10] Kromě studií povrchu a struktury se čím dál častěji vědci zabývají procesy

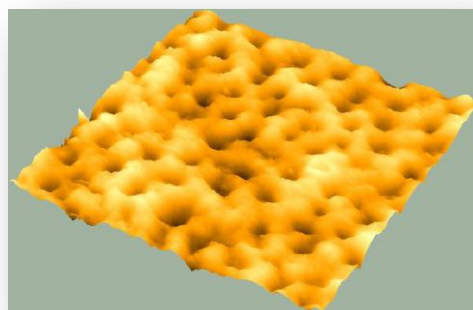
virové infekce v živých buňkách. Jsou pozorovány vstupy a výstupy viru do buňky a tím vzniklé strukturální změny infikovaných buněk. Měří se interakční síly mezi virem a dalšími molekulami včetně buněčných receptorů. Také se provádí analýza mechanických vlastností virů. Obecně jsou studovány čtyři mechanické vlastnosti virové částice pomocí AFM. Je to tuhost částice, vnitřní pružnost, strukturální pevnost (odolnost proti mechanickému selhání) a odolnost vůči únavě materiálu (virové částice jsou cyklicky vystaveny namáhání). Podle těchto vlastností se dá například poznat, zda se jedná o zralé nebo nezralé formy viru. Zralý virion HIV-1 je mnohem méně tuhý a vnitřně pružnější než virion nezralý. [12]



**Obr. 23** metodou AFM je zobrazen virus HIV typu 1 s vysokým rozlišením. Díky kompletní morfologické charakterizaci, můžeme rozpoznávat jedná-li se o zralý nebo nezralý vir. Při rozpoznání specifických struktur uvnitř jádra viru např. psi-RNA, můžeme rozhodnout o jaký typ viru jde (v tomto případě HIV-1). [20], [12]

#### 2.6.4.6. Tkáň

Díky své členité a měkké struktuře jsou tkáně většinou obtížně zobrazovány. Úspěšně se ale podařilo zobrazit několik různých tkání. Pomocí AFM se zobrazuje např. uspořádání kolagenových vláken rohovky a sklivce po laserovém zákroku. Navíc je AFM zobrazování využíváno při studiu povrchových vlastností měkkých kontaktních čoček. Zvláštní význam má AFM v analýze zubní tkáně. Zabývá se procesem demineralizace, strukturou výplňových materiálů nebo působení bělicích past na sklovinu. Zvláštní studie se zabývá desenzibilizací odhalených zubních krčků. Kde snížení citlivosti je možné dosáhnout



**Obr. 24** AFM sken povrchu dentinu s tubuly, skenovaná oblast 80  $\mu\text{m}$  [2]

zamezením průtoku kapaliny dentinovými tubuly (např. laserovým svazkem). Na obrázku 24 zobrazen povrch dentinu s tubuly. Dále lze pozorovat strukturu vlasů imobilizovaných na povrchu epoxidové pryskyřice (výzkum vlasové kosmetiky) a díky své relativní tvrdosti se dají zobrazit i tkáně rostlinné. [9]

## 2.7. SUBSTRÁTY PRO AFM

Stejně jako v případě elektronové mikroskopie, i pro AFM musí být vzorky uchyceny k pevnému podkladu (substrátu). Ideální povrch substrátu by měl být atomárně rovný, bez jakýchkoliv nerovností. Dále musí substrát svými povrchovými vlastnostmi umožnit dostatečně silnou interakci se vzorkem, aby během skenování nebyl vzorek z povrchu substrátu odstraněn skenujícím hrotem. Někdy je zároveň potřeba zajistit, aby interakce vzorku se substrátem nebyly až příliš silné, protože v tomto případě může být struktura zobrazované makromolekuly vážně deformována. Substrát se musí připravovat těsně před nanesením vzorku, protože by mohlo dojít ke kontaminaci. Vzniklé artefakty by mohly během skenování rušit (na vzduchu se všechny povrchy brzy pokryjí vrstvou organických nebo anorganických kontaminací). Na rozdíl od elektronové mikroskopie (EM) a STM metoda AFM nevyžaduje, aby byl podklad pro uchycení vzorků vodivý. Dnes se mezi nejdůležitější substráty v biologických AFM aplikacích řadí v monovrstvách vytvářené zlaté filmy, vrstevnaté dichalkogenidy přechodných kovů, amorfní tenké filmy, křemík, sklo a slída. Zejména **krycí sklička a čerstvě odštipnutá slída** bývají běžně používána pro adsorpci nejrozličnějších makromolekul. [26]

- **Slída (mica)** je atomárně hladký povrch s negativním nábojem vhodný pro imobilizaci DNA ale i celých buněk. Slída se velmi často povrchově upravuje tzv. silanizací (poly-L-lysinem oktadecyltrichlorsilanem, methyltrimethoxysilanem, apod.).
- **Sklo** má povrch vhodný k uchycení větších molekul, ovšem velmi náchylný ke kontaminaci.
- **Zlato** je chemicky velmi odolný povrch, který se dá snadno modifikovat.
- **Grafit** je silně hydrofobní substrát.

- **Plast** má výborné adherentní vlastnosti pro různé typy buněk. Používají se plastová sklíčka typu Thermanox.

## 2.8. IMOBILIZACE MOLEKUL

Po zbavení se mechanických a chemických nečistot na povrchu substrátu lze přistoupit k samotné imobilizaci. Imobilizace nebo-li znehybnění biologických vzorků uchycením k pevnému podkladu, tak aby se nepoškodila původní aktivita vzorku, je základem pro AFM skenování.

Nejjednodušší metodou je **nanesení vzorku v roztoku na substrát a následné vysušení**. Vzorek v kapalině může být na substrátu přímo vysušen (stlačeným vzduchem, proudem inertního plynu) nebo se nechá na substrátu inkubovat a následně se odstraní opláchnutí, potom je teprve vysušen.

**Fyzikální uchycení molekul prostřednictvím adsorpce** zprostředkované elektrostatickou nebo hydrofobní interakcí je další velmi často používanou metodou k uchycení vzorků. Interakce zprostředkující adsorpci vzorku k substrátu mají původ ve van der Waalsových silách, elektrostatické interakci nebo hydratačních a hydrofobních efektech. Adsorpce vzorku na substrát je proces, který závisí zejména na koncentraci vzorku, jeho čistotě, povrchovém rozložení náboje na substrátu, velikosti a povrchovém náboji vzorku, iontové síle a pH roztoku, ve kterém je vzorek rozpuštěn. (Wagner 1998)

Imobilizaci vzorku můžeme provést také **chemickým navázáním nebo zesítním molekul k povrchu**. Mezi chemickou skupinou na vzorku a funkčními skupinami na povrchu substrátu se vytvoří stabilní kovalentní vazba. [18]

Důležitou součástí přípravy vzorku je oplachování. K tomuto účelu se používá velmi čistá MiliQ voda, která se připravuje filtrací přes speciální Milipore membránu.

## 2.9. PRACOVNÍ PROSTŘEDÍ AFM MIKROSKOPŮ

**Vzduch.** Uživatelsky nejjednodušším prostředím a méně náročným pro obsluhu je vzduch. U některých SPM metod může být práce na vzduchu obtížná, protože na většině povrchů se vytváří vrstvy oxidů a jiných nečistot. Ty mohou negativně ovlivňovat fyzikální vlastnosti materiálů a vedou ke zkreslení výsledků (např. vliv na tunelové proudy). AFM nezávisí na vodivosti vzorku, a proto může zobrazovat jakékoliv povrchy vodivých i nevodivých materiálů. Nejčastějším problémem při zobrazování na vzduchu je kondenzace vody na povrchu vzorku. Optimální je zobrazovat vzorky při relativní vlhkosti do 40%.

**Kapalná prostředí.** AFM mikroskopy zobrazují bez větších problémů vzorky v kapalném prostředí s vysokým rozlišením. Odpadá problém s kondenzací vody, ale je mnohem obtížnější uchytit studované vzorky k povrchu substrátu. Díky zobrazování v kapalinách, je možné sledovat v reálném čase dynamické strukturální změny u nativních molekul a interakce mezi makromolekulami ve fyziologicky blízkém prostředí. Zobrazování v kapalinách umožňuje eliminaci artefaktů vznikajících při oplachování a vysoušení vzorků během imobilizačních procedur. Součástí AFM mikroskopu bývá uzavíratelná komůrka (liquid cell), která umožňuje snadné zobrazování v kapalinách, kontinuální výměnu zobrazujících kapalin a minimalizuje teplotní nestabilitu přístroje. Do kapaliny se během skenování mohou dodatečně přidat např. vazebné proteiny, kofaktory nebo inhibitory. Nevýhodou tohoto zobrazování souvisí s rychlostí biologických reakcí a sníženou rychlost skenování vzorku (1 sken trvá asi 30 s a většina biologických reakcí se odehrává v časové škále milisekund až sekund). [9], [26]

Méně časté prostředí pro zobrazování je ultravysoké vakuum (UHV) nebo elektrochemická prostředí ty se využívají spíše při měření jinými technikami SPM.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V rámci bakalářské práce byly připraveny a skenovány tři mikrobiologické vzorky. Jednalo se o bakterie *B. cereus*, *S. intermedius* a *K. oxytoca*. Na základě teoretických znalostí o mikroorganismech a metodě samotné byly pomocí AFM mikroskopu SOLVER NEXT získány obrazy povrchů jednotlivých bakterií.

#### 3.1. MATERIÁL A PŘÍPRAVA VZORKU

##### 3.1.1. MIKROORGANISMY

*Bacillus cereus* je gram-pozitivní pohyblivá bakterie. Ve vegetativní fázi buněk má tvar zaoblené tyčinky s rovným okrajem a rozměry 1 x 3-8  $\mu\text{m}$ . Za nepříznivých podmínek se tvoří oválné spory uvnitř bakterie, tzv. endospory, které ale tvar bakterie nemění.

*Staphylococcus intermedius* je gram-pozitivní, nepohyblivá a nesporulující bakterie. Má kulovitý tvar tzv. koky, a často tvoří shluky ve tvaru hroznu. Průměr koků je kolem 1  $\mu\text{m}$ .

*Klebsiella oxytoca* je gram-negativní, nepohyblivá bakterie. Tvoří zaoblené tyčinky velikosti asi 2 x 0,5  $\mu\text{m}$ .

##### 3.1.2. POMNOŽOVACÍ PŮDA

Byla použita pomnožovací půda **Brain Heart Infusion Broth** od firmy **HIMEDIA**. Je to půda pro pomnožování a kultivaci patogenních koků a ostatních nutričně náročných mikroorganismů z krevních vzorků a klinického materiálu.

##### **Obsahuje:**

200 g/l telecí mozková infuse	5 g/l chlorid sodný
250 g/l hovězí srdcová infuse	2,5 g/l hydrogenfosforečnan (di) sodný
10 g/l proteasový pepton	2 g/l dextrosa

neobsahuje živočišné peptony a má konečné pH (při 25°C)  $7,4 \pm 0,2$

**Příprava půdy:** Bylo odváženo 37 g přípravku, smícháno s 1000 ml destilované vody a směs zahřívána do rozpuštění. Získaný roztok byl nalit do zkumavek a sterilizován v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. [8]



### 3.1.3. PŘÍPRAVA VZORKU

- Bakterie z krevního agaru byly nakultivovány do připravené stacionární fáze ve zkumavce pomocí sterilní kličky. Doba inkubace byla 24 hod.
- Do tří zkumavek bylo odpipetováno po 1 ml jednotlivé kultury a do čtvrté zkumavky 1 ml vody pro vyvážení v centrifuze. Zkumavky byly zcentrifugovány na 3000g po dobu 10 minut a při 20°C.
- Byl odsán supernatant a buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS (pufrovaný fyziologický roztok).
- Opětovně byla suspenze zcentrifugována při stejných podmínkách (3000g, 10 min., 20°C).
- Buňky byly znovu resuspendovány v 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (deionizovaná voda).
- Z takto připravené suspenze bylo pipetou odebráno 10  $\mu$ l a doprostřed čistého a odmaštěného krycího sklíčka byla udělána kapka.
- Suspenze se nechala zaschnout na vzduchu. Na místě kapky se vytvořil viditelně matný povrch. (Fixace plamenem se nedoporučuje.)

## 3.2. MĚŘICÍ PŘÍSTROJ

**SOLVER NEXT** ruské firmy NT-MDT je jedním z nejmodernějších přístrojů, který sestrojili vývojáři pro široké spektrum využití. S tímto přístrojem se dají velice rychle získat výsledky měření bez ztráty kvality rozlišení, je velice přesný a snadno nastavitelný pro dané měření.

Přístroj má speciální duální systém řízení hlavy, proto je možné měřit jak metodou AFM tak STM bez složité výměny hlavic. Další součástí přístroje je komora, do které se vkládá vzorek. Po vložení vzorku se komora uzavře a vytvoří se homogenní prostředí. Udržuje konstantní teplotu, vlhkost a zabraňuje nepříznivým vnějším vlivům. Při otevřených dvířkách komory nikdy nesvítí laserový paprsek. Velkou výhodou přístroje je navigační kamerový systém, díky kterému můžeme pod cantilever (hrot) nastavit tu část vzorku, kterou



*Obr. 25 SOLVER NEXT [33]*

chceme proměřit. Nemusíme přístroj kombinovat třeba s optickým mikroskopem. Systém si pomocí vlastních senzorů vyrovnává piezoelektrické nedokonalosti (vlastní nelinearita, hystereze atd.). Přístroj lze řídit a nastavovat pomocí inteligentního softwaru. Mikroskop je umístěn na antivibračním stole, přesto je během měření třeba se vyvarovat většímu hluku a otřesům. Velikost skenovaného vzorku může být až 20 mm v průměru, výška 10 mm a maximální hmotností 40g. Velikost skenované plochy může být až 100x100x10  $\mu\text{m}$ . [33]

Označení použitých hrotů při skenování je NSG10, výrobce NT-MDT. Materiál je monokrystalický křemík bez coatingu (povrchové vrstvy). [34]

Vzorky můžeme měřit základními technikami STM a AFM mikroskopie (topografii, detekci fázových posunů, měření elektrických vlastností, provádět nanolitografii atd.). Výběr režimu a prostředí, ve kterém se měří, závisí na charakteru vzorku.

### **3.2.1. SKENOVÁNÍ VZORKŮ**

Zaschlé vzorky na podložním sklíčku se musí nejprve upravit. Sklíčko se ořeže tak, aby se vešlo do komory. Pomocí oboustranné lepicí pásky se připevní na kovovou podložku. Ta se vkládá do komory na magnet připevněný ke scanneru. Dvířka komory se zavřou, aby se prostředí vzorku homogenizovalo.

Pomocí navigačního kamerového systému, nastavíme část vzorku, kterou chceme proměřovat pod cantilever. Posledním krokem je nastavení parametrů měření, kterých může být několik stovek. Jedny ze základních jsou: počet bodů na řádek, velikost skenu, rychlost skenování, setpoint, gain, atd. Někdy je také vhodné zasáhnout do naměřených dat během měření, pokud obsahují zřejmé vady, jako jsou ostré špičky, šmouhy ve směru skenování (vzniklé zachycením slabě vázané nečistoty, u biologických aplikací jde často o části vzorku) a skoky v intenzitě obrazu (jev vzniká náhlou změnou vlastností hrotu, například se kousek hrotu ulomí nebo vrchol hrotu změní tvar). Tyto vady lze s různým efektem softwarově odstranit.

Výsledné snímky lze jednoduše exportovat v obrázkové podobě nebo v číslíkovém maticovém záznamu.

## 4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

Úkolem této bakalářské práce bylo seznámit se s technikami SPM, které se mohou vhodně využívat při měření biologických vzorků. Zvláštní pozornost byla věnována Mikroskopii atomárních sil (AFM). Po zvládnutí teoretické přípravy bylo přistoupeno k vlastnímu měření, které demonstrovalo využití metody k získávání informací o biologických (mikrobiologických) vzorcích.

Po teoretickém nastudování zobrazovací techniky AFM a přípravy vzorků bylo přistoupeno k vlastnímu měření. Po konzultaci s Ing Tiburem Füzikem z Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha byly připraveny tři mikrobiologické vzorky pro měření AFM. Správné nastavení parametrů, použití kvalitního hrotu a ideální vnější prostředí bylo podmínkou pro průběh přesného měření. Při skenování byly sbírány 4 signály. Dva z nich se týkaly topografie (směr dopředu a zpět), další magnituda a nakonec fázový posun. Naměřené hodnoty vzorků byly prezentovány jako topografický obraz. Díky moderním aplikacím v softwaru se dalo s obrazy libovolně manipulovat, upravovat a ukládat je ve vhodném formátu. Výsledné topografie jednotlivých vzorků byly zobrazeny v 2D a 3D obrazech a u posledního vzorku byl proveden detailní výřez. Pohyb skeneru ve směru osy  $x$  a  $y$  dává informace o vzorku v rovině. Výškové hodnoty v jednotlivých bodech (osa  $z$ , kolmá k této rovině) jsou ve výsledných obrazech vyjádřeny barevnou škálou. Určitá výška je přiřazena k danému odstínu barvy, který je možné si vybrat. U všech 2D obrazů je tato stupnice umístěna po pravé straně. Hodnoty v ose  $x$  a  $y$  jsou udány v jednotkách  $\mu\text{m}$ , hodnoty osy  $z$  jsou v  $\text{nm}$ . Velikost skenu je  $10 \times 10 \mu\text{m}$  a výřez (**Obr. 28c a Obr. 28d**)  $3 \times 3 \mu\text{m}$ .

Obraz prvního vzorku fixované kultury *B. cereus* v dvojrozměrném (2D) zobrazení je přiložen v příloze **Obr. 26a** a v trojrozměrném (3D) zobrazení na **Obr. 26b**. Snímek je pořizován metodou TP-AFM na vzduchu. Tyčinkovité struktury s oblými konci a rozměry asi  $1 \times 3-6 \mu\text{m}$  odpovídají velikostí i tvarem pozorované bakterii. Dokonalejšímu obrazu jednotlivých buněk bránilo nedostatečné ředění suspenze. Připravený vzorek byl moc hustý, a proto od sebe buňky nejsou na **Obr. 26a, 26b** dostatečně oddělené. Přesto jsou mikroorganismy dobře rozeznatelné.

Druhý sken **Obr. 27a** (2D obraz) a **Obr. 27b** (3D obraz) byl pořízen ve stejném režimu a na vzduchu. Vyobrazeny jsou kulovité struktury o velikosti průměru 1  $\mu\text{m}$ , což podle odborné literatury odpovídá velikostí i tvarem *S. intermedius*. I v tomto případě mohla být suspenze více naředěná. Velikost struktur je hůře čitelná, pokud nejsou umístěné na substrátu ale na mase buněk.

Na skenu posledního námi studovaného biologického vzorku (*K. oxytoca*; Obr. 28a, 28b) se v popředí obrazu objevily zvláštní útvary, které svým tvarem ani velikostí neodpovídají literárním údajům o *K. oxytoca*. Pravděpodobně se jednalo o kontaminaci vzorku při jeho přípravě. Mohlo by se jednat i o zbytky poškozených buněk, ale domníváme se, že jde spíše o drobné krystaly neznámé látky. Toto znečištění zamezilo získání kvalitního zobrazení buněk (ve 3D zobrazení není téměř patrná přítomnost mikroorganismu), proto byl udělán výřez na vhodném místě skenu (na Obr. 28a vyznačen čtvercem). **Obr. 28a** (2D) a **Obr. 28b** (3D) zobrazují původní celý sken, **Obr. 28c** a **Obr. 28d** jeho výřez. Ve výřezu jsou zobrazeny struktury tyčinkovitého tvaru téměř bez překrytí nečistotami. Svoji velikostí i tvarem souhlasí se strukturou *K. oxytoca*. Výřez skenu nám umožnil detailně zmapovat povrch bakterie. I v tomto případě bylo vlastní měření prováděno v TP-AFM režimu na vzduchu.

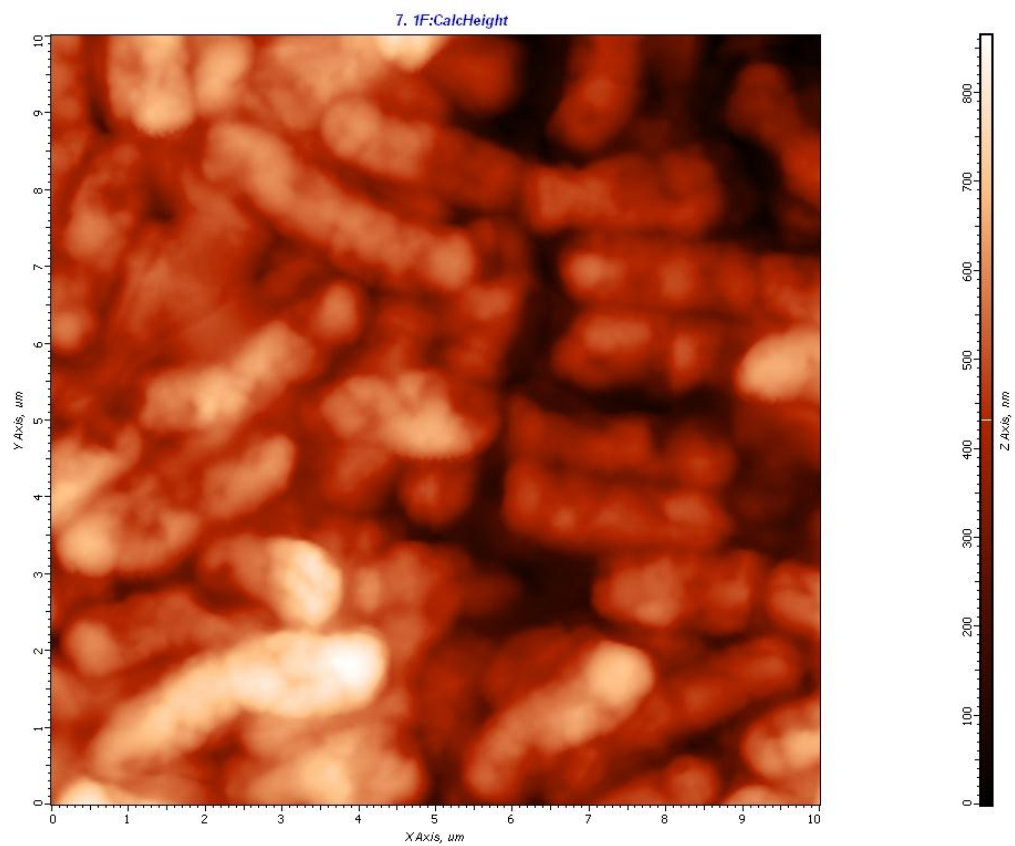
Závěrem lze uvést, že provedená měření ukázala, že AFM metoda je vhodnou pro studium biologických vzorků a to nejen svou nenáročností na úpravu vzorku a možnostmi výběru prostředí, ale hlavně možnostmi snadného a rychlého dosažení výsledků bez ztráty kvality rozlišení. Vzhledem k omezenému času pro vypracování bakalářské práce nebylo možné zcela optimalizovat postup přípravy biologických vzorků (viz např. uvedené malé ředění případně znečištění povrchu vzorku), a proto jsou na i získaných 3D a 2D obrazech vzorků nedokonalosti. Nicméně provedené experimenty prokázaly užitečnost této metody (a použitého zařízení SOLVER NEXT) pro studium biologických vzorků. V tomto směru by bylo vhodné v budoucnu pokračovat ve spolupráci mezi KBBV a KOAnCH při studiu biologických materiálů.

## 5. ZÁVĚR

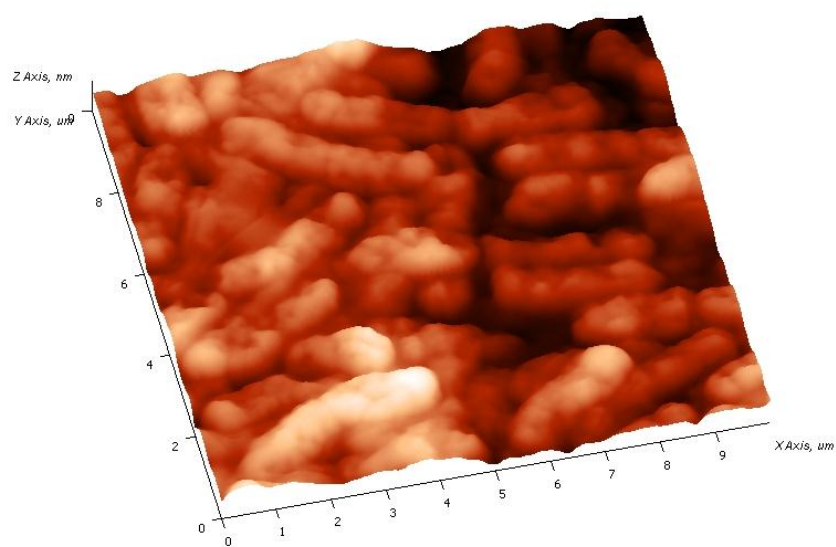
Úkolem této bakalářské práce bylo seznámit se s technikami Mikroskopie skenující sondou (SPM), které se mohou vhodně využívat při měření biologických vzorků. V teoretické části byl zpracován obecný princip metody, konstrukce mikroskopu, nelinearity přístroje při měření a zvláštní pozornost byla věnována Mikroskopii atomárních sil (AFM). Dále byly popsány režimy AFM a jejich vhodné použití pro různé typy vzorků. Samostatná kapitola je věnována některým aplikacím AFM, zvláště pak biologickým. V závěru této části byl nastíněn postup přípravy vzorků pro měření AFM. Po rešeršním zpracování problematiky zobrazování biologických vzorků metodou AFM byly jako vhodný biologický objekt k AFM zobrazování vybrány mikrobiologické kultury *B. cereus*, *S. intermedius* a *K. oxytoca*. Důvodem preference těchto mikroorganismů je znalost parametrů, definujících jejich zobrazení. V odborné literatuře jsou pevně dána rozmezí velikostí jednotlivých objektů a je znám jejich tvar (šířka, délka nebo průměr u kulovitých bakterií). Jen výjimečně někteří jedinci vybočují z těchto hodnot. Svou roli při výběru vhodného biologického vzorku hrál také fakt, že mikrobiologické kultury jsou na Katedře biologických a biochemických věd (KBBV) snadno dostupné. Na Katedře obecné a anorganické chemie (KOAnCh), která mi umožnila měření vzorků pomocí mikroskopu AFM SOLVER NEXT, se zabývají především studiem organokovových sloučenin a chalkogenidů kovů. Provedené měření bylo prakticky prvním testováním využití tohoto zařízení pro studium biologických vzorků. Proto jsme zvolili méně náročné měření topografie mikrobiologických vzorků, které posloužilo jako názorná ukázka jedné z aplikací AFM v biologii.

Z naměřených výsledků lze usuzovat, že by bylo vhodné připravovat suspenze pro nátěr vzorků o menší koncentraci. Při menší hustotě by byly obrazy povrchu mikroorganismů daleko čitelnější a přesnější. Je nutné se vyvarovat kontaminaci vzorku, jako se stalo u třetího vzorku (Obr. 28a až 28d v příloze). Kde je vidět, jak těžké je v přítomnosti nečistot pozorovat daný objekt. Celkově ale měření pomocí AFM prokázalo, že je vhodnou metodou pro zobrazování mikrobiologických povrchů a přístroj SOLVER NEXT je možnou variantou pro studium biologických materiálů na KBBV.

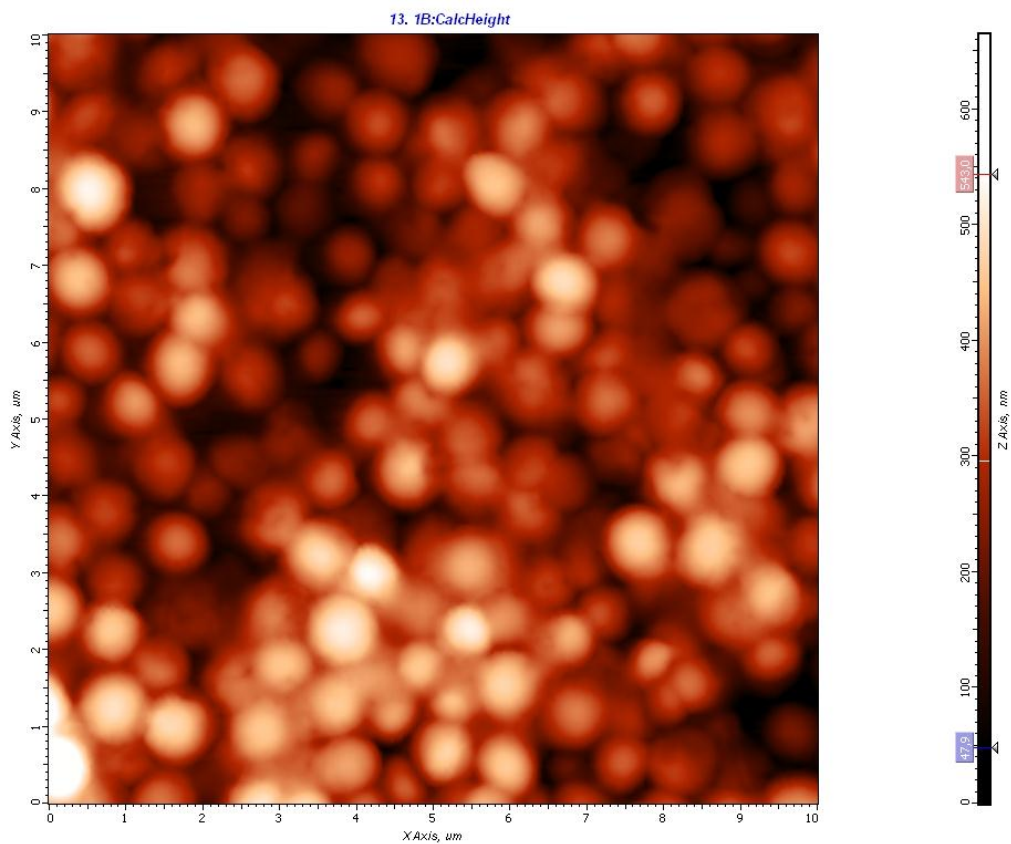
## 6. PŘÍLOHY



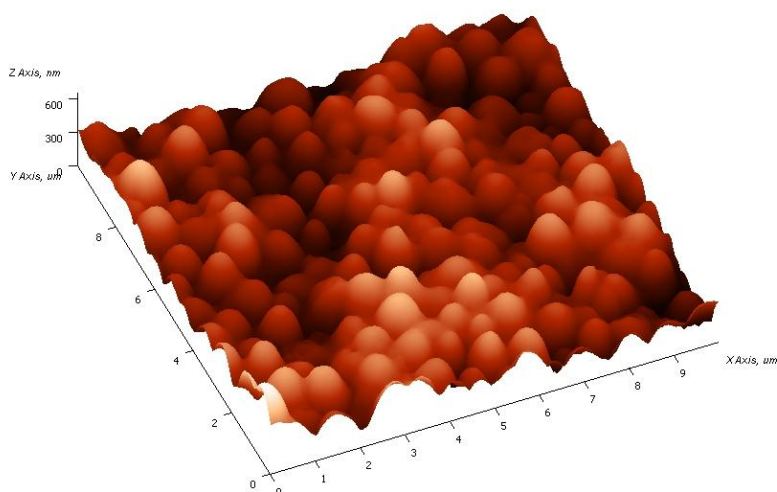
*Obr. 26a* 2D AFM snímek povrchu *B. cereus*, zobrazeno TP-AFM na vzduchu



*Obr. 26b* 3D AFM snímek povrchu *B. cereus*, zobrazeno TP-AFM na vzduchu

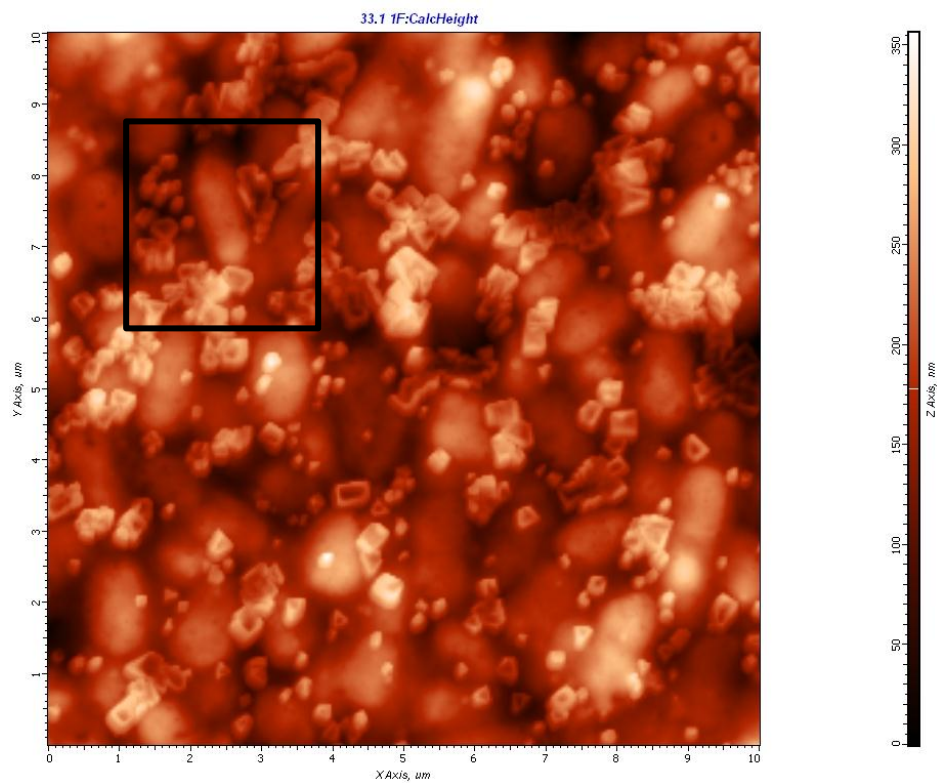


**Obr. 27a** 2D AFM snímek povrchu *S.intermedius*, zobrazeno TP-AFM na vzduchu

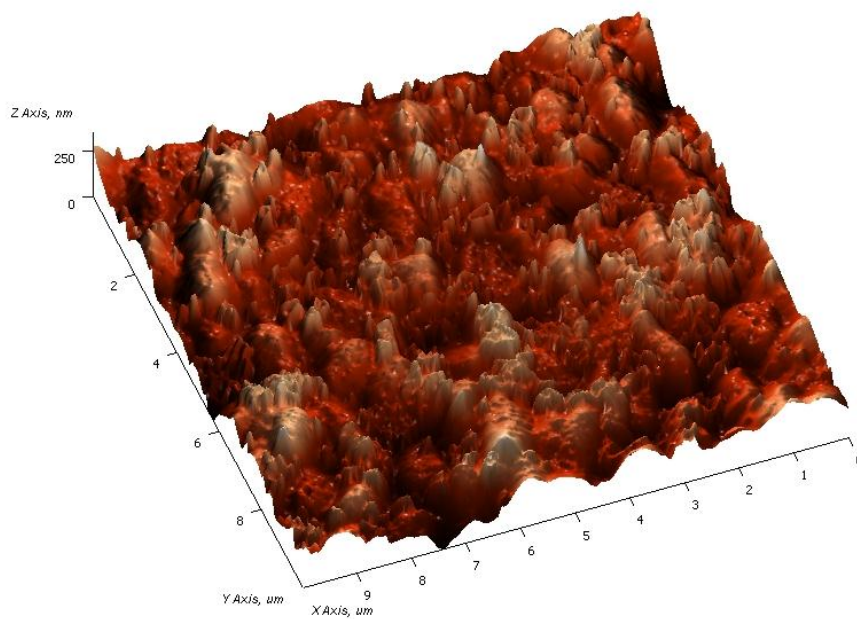


**Obr. 27b** 3D AFM snímek povrchu *S. intermedius*, zobrazeno TP-AFM na vzduchu



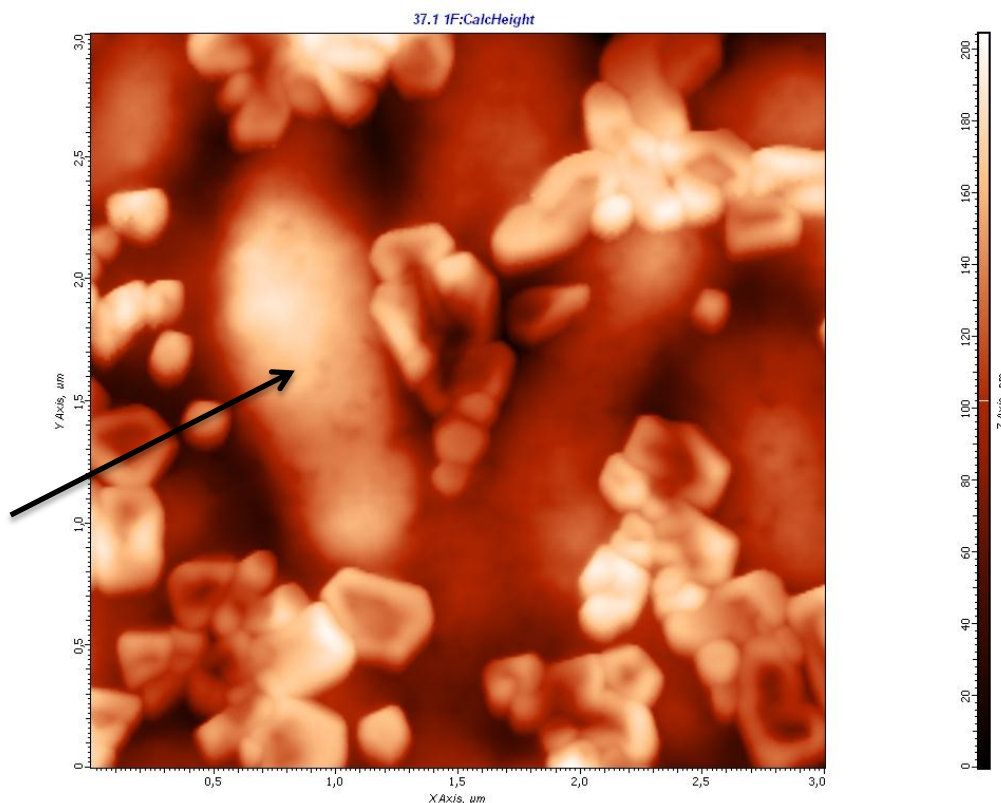


*Obr. 28a* 2D AFM snímek povrchu *K. oxytoca*, zobrazeno TP-AFM na vzduchu, čtvercem označený výřez je zobrazený na *Obr. 28c*

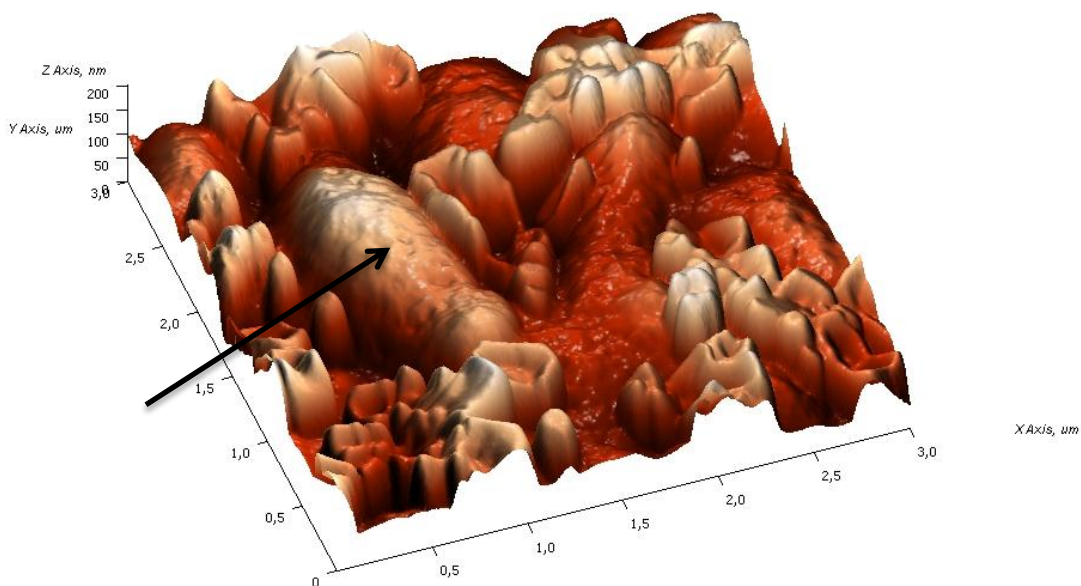


*Obr. 28b* 3D AFM snímek povrchu *K. oxytoca*, zobrazeno TP-AFM na vzduchu





**Obr. 28c** 2D AFM sken *K. oxytoca*, výřez z **Obr. 28a**, skenováno na vzduchu TP-AFM  
 Šipka označuje strukturu buňky *K. oxytoca*, ostatní je znečištění vzorku.



**Obr. 28d** 3D AFM sken *K. oxytoca*, výřez z **Obr. 28b**, skenováno na vzduchu TP-AFM  
 Šipka označuje strukturu buňky *K. oxytoca*, ostatní je znečištění vzorku.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KUBÍNEK, ROMAN; VŮJTEK, MILAN; MAŠLÁŇ, MIROSLAV. Mikroskopie skenující sondou; 1. vydání Olomouc; Univerzita Palackého v Olomouci, 2003; 145s; ISBN 80-244-0602-0
- [2] MACHALA, LIBOR; KUBÍNEK, ROMAN; VŮJTEK, MILAN; MAŠLÁŇ, MIROSLAV. Mikroskopie skenující sondou; Univerzita Palackého v Olomouci, 2003; [online] Dostupné z <http://atmilab.upol.cz/mss/index.html>
- [3] BREŇ, DAVID; KULHÁNEK, PETR. Pikoškály aneb jak uvidět atom. Mikroskop atomárních sil; ALDEBRARAN BULLETIN, 2004; roč. 2; č. 27; [online] Dostupné z [http://www.aldebaran.cz/bulletin/2004\\_27\\_pic.html](http://www.aldebaran.cz/bulletin/2004_27_pic.html)
- [4] JELÍNEK, PEVEL; HAPALA, PROKOP; CHÁB, VLADIMÍR. Rastrovací tunelová mikroskopie. Jitro a poledne kouzelníků; VESMÍR, 2010; roč. 89; str. 290; [online] Dostupné z <http://www.vesmir.cz/clanky/clanek/id/8791>
- [5] JANDA, PEVEL; WEBER, JAN. Mikroskopie rastrovací sondou. Nové mikroskopické techniky; VESMÍR, 1998; roč. 77; str. 381; [online] Dostupné z <http://www.vesmir.cz/clanek/mikroskopie-rastrovaci-sondou>
- [6] JENA, P. BHANU; HÖRBER, J. K. HEINRICH. Atomic Force Microscopy in cell biology. Methods in Cell Biology; Academic Press, 2002; svazek 68; 415s; ISBN 0123838517, 9780123838513
- [7] ROSYPAL, STANISLAV. Bakteriologie a virologie; 1. vydání Praha, 1994; 68s; ISBN 80-85827-16-6
- [8] Příbalový leták k přípravě pomnožovací pŕdy Brain Heart Infusio Broth od firmy HIMEDIA
- [9] KUBÍNEK, ROMAN; VŮJTEK, MILAN; ZAPLETALOVÁ, ZDEŇKA; HOLUBOVÁ, RENATA; KOLÁŘOVÁ, HANA. Biologické aplikace AFM. Československý Časopis pro Fyziku, 2003; svazek 53; č. 2; 109s
- [10] KUZNETSOV, YU. G.; MALKIN, AJ.; LUCAS, RW.; PLOM, M.; McPHERSON, A. Imaging of viruses by atomic force microscopy. Journal of General Virology, 2001; svazek 82; č. 9; [online] Dostupný z <http://jgv.sgmjournals.org/content/82/9/2025.full>
- [11] ROSYPAL, STANISLAV. Úvod do molekulární biologie. Molekulární biologie prokaryotické buňky; 4. vydání; Brno, 2006; 290s; ISBN 80-902562-5-2
- [12] MATEU; MAURICIO G. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy. A virological perspective; 2012; [online] Dostupný z <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170212002055>

- [13] HORŇÁKOVÁ, VERONIKA. Nové nanobiotechnologické metody pro výzkum poškození DNA na úrovni jednotlivých molekul; Masarykova univerzita; Přírodovědecká fakulta; Ústav biochemie; Brno, 2012; [online] Dostupné z [http://is.muni.cz/th/211060/prif\\_m/Diplomka\\_last\\_version\\_Gwyddion.pdf](http://is.muni.cz/th/211060/prif_m/Diplomka_last_version_Gwyddion.pdf)
- [14] YANG, Y.; WANG, H.; ERIE, D. A. Quantitative characterization of biomolecular assemblies and interactions using atomic force microscopy. *Methods*; 2003; svazek 29; str. 175-187
- [15] BERQUAND, ALEXANDR. Advances toward Medical Nano-Imaging by High-Resolution. *Atomic Force Microscopy*; BRUKER; [online] Dostupné z [http://www.bruker-axs.com/fileadmin/user\\_upload/PDF\\_2011/application\\_notes/Advances\\_toward\\_Medical\\_Nano-Imaging\\_by\\_High-Resolution\\_Atomic\\_Force\\_Microscopy\\_AFM\\_AN120.pdf](http://www.bruker-axs.com/fileadmin/user_upload/PDF_2011/application_notes/Advances_toward_Medical_Nano-Imaging_by_High-Resolution_Atomic_Force_Microscopy_AFM_AN120.pdf)
- [16] A Review of the Universe - Structures, Evolutions, Observations, and Theories; Unicellular Organisms; [online] Dostupné z <http://universe-review.ca/F11-monocell.htm>
- [17] SHAO, Z.; MOU, J.; CZAJKOWSKY, D. M.; YANG, J.; YUAN, J. Biological atomic force microscopy. What is achieved and what is needed; *Advances in Physics*, 1996; svazek 45, str. 1-86
- [18] WAGNER, PETER. Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy; 1998; svazek 430; str. 112 - 115; [online] Dostupné z <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579398006140>
- [19] JANDA, PAVEL; FRANC, JIŘÍ; PELOUCHOVÁ, HANA; WEBER, JAN. Nové mikroskopické a analytické techniky. *Mikroskopie rastrovací sondou*; Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AVČR; Praha; [online] Dostupné z <http://www.njh.cz/seminare/457865/1270587>
- [20] CASTELNOVO, M.; FAIVRE-MOSKALENKO, C. Structural and mechanical properties of viral capsids at the single virus level: an AFM study of HIV-1; *Laboratoire de Physique ENS de Lyon – UMR 5672*; [online] Dostupné z [http://www.ens-lyon.fr/PHYSIQUE/index.php?langue=anglais&page=equipe1&souspage=POBS\\_P](http://www.ens-lyon.fr/PHYSIQUE/index.php?langue=anglais&page=equipe1&souspage=POBS_P)
- [21] Agilent Technologies; [online] Dostupné z <http://cp.literature.agilent.com/litweb/pdf/5989-6983EN.pdf>
- [22] NT-MDT; [online] Dostupné z <http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/afm>
- [23] GERLA, VÁCLAV. Nanotechnologie v medicíně. *Fyzikální metody v Medicíně II.*, 2002; [online] Dostupné z <http://nanomedicina.sweb.cz/#SPM>
- [24] Fyzmatik píše; 2008; [online] Dostupné z <http://fyzmatik.pise.cz/72609-piezoelektricky-jev.html>

- [25] Stručný popis metod SPM; [online] Dostupné z <http://atmilab.upol.cz/texty/ospm.pdf>
- [26] [http://atmilab.upol.cz/texty/dipl\\_bio.pdf](http://atmilab.upol.cz/texty/dipl_bio.pdf)
- [27] NT-MDT <http://www.ntmdt-tips.com/text/general-information>
- [28] NT-MDT <http://www.ntmdt-tips.com/products>
- [29] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/afm-constant-force-mode>
- [30] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/afm-constant-height-mode>
- [31] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/non-contact-mode>
- [32] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/semicontact-mode>
- [33] NT- MDT <http://www.ntmdt.com/device/solver-next>
- [34] NT- MDT <http://www.ntmdt-tips.com/products/view/nsg10>
- [35] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/scan-gallery/scan/flower-shaped-dna>
- [36] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/scan-gallery/scan/supercoiled-circular-plasmide-dna>
- [37] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/scan-gallery/scan/antibody-molecules-2>
- [38] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/spm-notes/view/suspension>
- [39] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/scan-gallery/scan/ferritin-clusters-1>
- [40] NT-MDT <http://www.ntmdt.com/scan-gallery/scan/collagen-molecules-1>