

Количественные методики восстановления
истинных топографических свойств
объектов по измеренным
АСМ-изображениям:
Часть 2. Эффект уширения АСМ-профиля

М. О. Галлямов, И. В. Яминский

*Физический факультет Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова, Москва*

Аннотация

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

Эффект уширения проявляется в том, что микрообъекты, визуализированные АСМ, имеют завышенные латеральные размеры. Например, при АСМ исследованиях молекул нуклеиновых кислот [1] этот эффект облегчает идентификацию молекул: “уширенные” молекулы¹ легче обнаружить на кадре значительной площади, что облегчает набор статистики. В силу этого, при исследовании нуклеиновых кислот, эффект уширения позволяет обходиться без дополнительного контрастирования макромолекул (уранилацетатом и пр.).

Эффект уширения связан с тем, что зондирующее острие микроскопа имеет конечный радиус кривизны кончика. Эту аппаратную погрешность трудно преодолеть, поскольку уменьшение радиуса кривизны кончика зонда (использование более острых зондов) приводит к увеличению давления в области контакта (при том же значении величины контактных

¹Ширина профиля молекулы ДНК завышается в 5–10 раз

сил). Большее давление приводит к большим контактным деформациям зонда и образца, что сказывается на увеличении как латеральных размеров области контакта (ограничение достижимого пространственного разрешения), так и радиусов кривизны контактирующих поверхностей.

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

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

В работе [3] предложена универсальная компьютерная методика деконволюции АСМ-изображений, включающая два этапа: определение геометрии используемого острия с помощью тест-объектов и свертку инвертированной геометрии острия с измеренным АСМ-профилем; эта процедура позволяет во многих случаях восстановить исходный профиль объекта с высокой точностью. Мы проводили тестирование данной методики, решая задачу восстановления геометрии объектов, адсорбированных на поверхность плоской подложки. Анализ показал, что восстановленные по данной методике латеральные размеры объекта (ширина на полувысоте²) существенно *завышены* при условии, что радиус кривизны объекта *меньше* радиуса кривизны кончика зонда (ошибка тем выше, чем больше разница соответствующих радиусов). Это обстоятельство осложняет применимость рассматриваемой методики при исследованиях биообъектов (макромолекул, их комплексов и пр.) в силу малости размеров последних в сравнении с радиусом кривизны кончика зонда АСМ.

В работе [4] предложена методика восстановления объема исследуемых частиц (по АСМ-профилю), не включающая стадию предварительного тестирования зонда: как геометрия зонда, так и геометрия объектов исследования может быть восстановлена путем анализа одного и того же АСМ-изображения. Однако данная методика включает априорное предположение о сферической форме исследуемых объектов. Но, в силу имеющихся представлений о существенной роли *контактных деформаций* в исследованиях АСМ представляется, что данное предположение вряд ли оправданно при решении задачи восстановления геометрии *биообъектов*, характеризующихся, как известно, невысокими значениями модуля

²этот параметр используется при определении объема исследуемого объекта

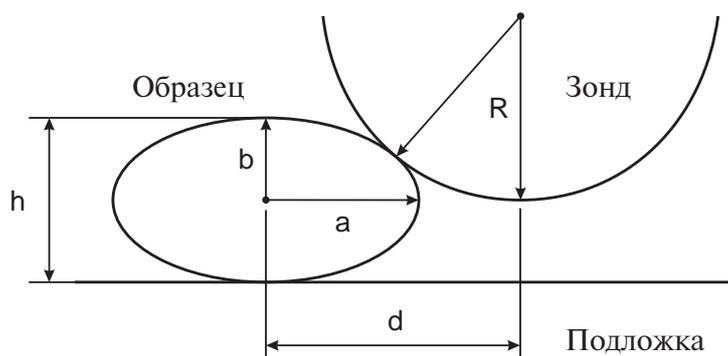


Рис. 1: Геометрия контакта зонда и образца (к объяснению эффекта уширения).

упругости. Более общей является модель, позволяющая учесть эффект уширения при контакте иглы с *деформированной* частицей, имеющей *эллипсоидальное* сечение. Но, насколько нам известно, в литературе отсутствуют работы, посвященные применению данной модели для анализа экспериментальных АСМ-изображений, что, по-видимому, обусловлено алгебраическими сложностями, возникающими при нахождении аналитического решения этой задачи.

Постановка и решение задачи о восстановлении реальной ширины объектов по измеренному АСМ-профилю

Мы применили для учета эффекта уширения геометрическую модель (рис. 1), учитывающую взаимодействие объекта только с кончиком зонда (предполагается, что нет контакта со стенками пирамиды). Это оправдано в том случае, когда высота исследуемых структур над подложкой не превышает радиуса кривизны кончика иглы.

Кончик зонда аппроксимировали либо полусферой радиуса R , либо параболоидом вращения (сечение иглы — парабола: $y = kx^2$, где k — коэффициент аппроксимации). При этом было показано, что результаты применения двух методик, фактически, тождественны. Количественное расхождение в ответах не превышает 3–9%. Стоит отметить, что аппроксимация иглы с помощью полусферы более наглядна и более широко используется в литературе. Мы ниже приводим алгоритмы использования обоих подходов.

Исследуемая частица описывалась моделью сплюснутого эллипсоида. Т.е. мы исходим из априорных представлений о контактной деформации образца под действием зонда. В сечении объекта исследования — эллипс

с полуосями a и b . Ставилась задача по заданным значениям b ($b = h/2$), R (или k для параболической аппроксимации) и d (где d — измеренная ширина профиля АСМ-изображения частицы на ее полувысоте) найти значение a .

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

$$\begin{cases} y_{ell} = b\sqrt{1 - x^2/a^2} \\ y_{cir} = R - \sqrt{R^2 - (x - d/2)^2} \end{cases}$$

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

Для решения задачи ставились условия для точки контакта с координатами (x_0, y_0) : равенство касательных к эллипсу и к окружности (параболы) и удовлетворение координат точки контакта уравнениям эллипса и окружности (параболы):

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

Для модели параболической иглы в системе (1) вместо уравнения окружности используется уравнение параболы. Данная система аналитически сводилась к одному уравнению с одним неизвестным $(x_0)^3$, для которого был создан алгоритм численного решения⁴. Ниже мы приводим эти уравнения для случая сферической иглы:

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

и для нахождения a по численно определенному x_0 :

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

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

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

³для x_0 уравнение проще

⁴далее, по найденному x_0 определялось a

и уравнение для определения a :

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

Аналитически было показано, что полученное уравнение (2) для сферической иглы не имеет единственного решения (на соответствующем промежутке) только в том случае, когда выполняется система неравенств:

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

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

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

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

Уравнения (2–5) использовались нами для построения численного решения. Казалось бы, поскольку все равно задача решалась численно, то для реализации численного решения можно было исходить непосредственно из системы (1), сведя ее, например, к системе нелинейных уравнений. Однако оказывается, что специфика системы не позволяет в этом случае построить достаточно простого численного решения, поскольку сколь угодно малые отклонения от точного решения приводят к отрицательным значениям в подкоренных выражениях, входящих в решаемую систему. В силу этого предложенный метод является, несмотря на необходимость предварительных аналитических выкладок, достаточно простым, кроме того, он имеет важное преимущество: проверка выполнения условий (6) и (7) позволяет заранее определить случаи отсутствия решений.

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

Определение точного значения радиуса R (или k) для конкретного зонда требует его тестирования непосредственно перед использованием (с помощью тест-объектов, например вирусных частиц [5]). Однако и в этом случае существует вероятность того, что в процессе сканирования форма иглы претерпит изменения в результате взаимодействия с

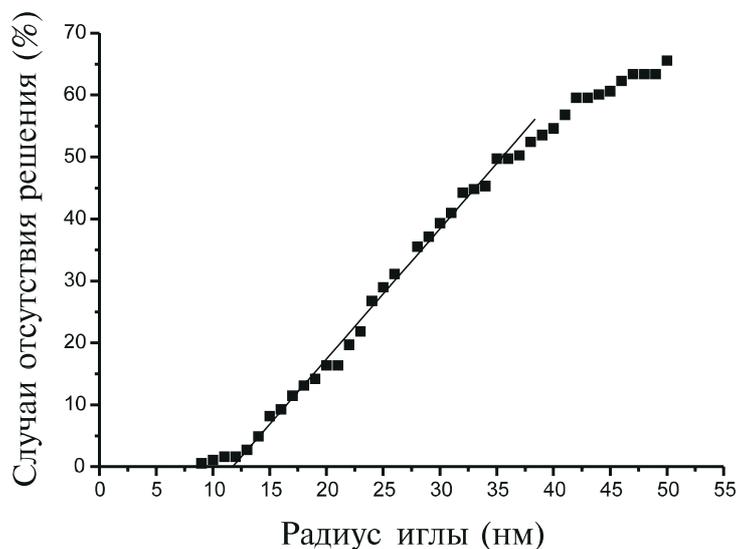


Рис. 2: Зависимость числа случаев отсутствия решения от радиуса аппроксимации иглы, проверка выполнимости условия (6).

объектом. В этой связи чрезвычайно полезным является получение информации о форме зонда непосредственно из АСМ-изображений объекта исследования.

Путем набора статистики параметров высоты и ширины профиля АСМ-изображений объектов исследования и последующего анализа выполнимости соотношений (6, 7) для набранной статистики можно определить предельное значение R (или k) выше (или ниже) которого рост числа случаев отсутствия решения. Это и будет верхнее граничное значения для оцениваемого радиуса кривизны иглы, см. рис. 2. Нижняя граница для радиуса кривизны зонда определяется контактными деформациями.

К вопросу о применимости разработанной методики

Следует подчеркнуть, что разработанная методика не учитывает возможного дополнительного вклада в уширение, связанного с частичным увлечением образца зондом при сканировании. Эффект увлечения обусловлен латеральными силами взаимодействия зонда и образца, которые характеризуются достаточно большой интенсивностью при проведении исследований в контактном режиме на воздухе, даже при минимизации нормальных сил. По нашим оценкам данный эффект, в основном, может проявляться при исследовании объектов, имеющих небольшую величину

площади сечения (например, одиночных молекул ДНК), и приводит к 1,5–2,5-кратному завышению значения ширины объекта d и, как следствие, восстанавливаемого значения a .

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

Применение разработанного алгоритма для восстановления морфологии комплексов ДНК-ПАВ

Мы применили разработанную методику для восстановления геометрии комплексов ДНК с поверхностно-активными веществами (ПАВ), перешедших через границу раздела фаз вода/хлороформ, (подробнее результаты изложены в [6]). Для каждой тороидальной частицы измерялись значения диаметра тора, ширины профиля на полувысоте и высоты над подложкой, средние значения этих параметров составили: $D \sim 100$ нм, $d \sim 25$ нм и $h \sim 5$ нм. Два последних значения использовались при восстановлении истинной ширины профиля частицы $2a$, по изложенной выше методике.

На рис. 2 представлен график зависимости числа случаев отсутствия решения от радиуса аппроксимирующего зонда, полученный путем тестирования выполнения условий (6) или (7). На основании рисунка можно сделать вывод, что верхняя граница значения R , характеризующего зонд, используемый при визуализации комплексов, составляет 12 нм (соответствует $k = 5,5 \times 10^{-2} \text{ нм}^{-1}$) — выше этого значения наблюдается линейный рост числа случаев отсутствия решения.

Мы подсчитали количество молекул ДНК, приходящихся на каждую тороидальную структуру, используя два различных значения R — 6 нм и 12 нм (соответствует $k = 13,2 \times 10^{-2} \text{ нм}^{-1}$ и $5,5 \times 10^{-2} \text{ нм}^{-1}$). Среднее значение параметра a (найденное численно) для этих случаев составляет 11 и 10 нм соответственно (относительное отклонение $\varepsilon = 0,5$). Результаты применения параболической модели иглы дают, как правило, значения для a на 3–9% выше. В рассматриваемом случае соответствующие численные решения составляют 12 и 11 нм. Таким образом, мы показали, что формой комплекса ДНК-ПАВ является сплюснутый тор. Восстановление геометрии комплекса позволяет провести количественный анализ его молекулярного состава, см. рис. 3.

Благодарность. Авторы выражают благодарность О. А. Пышкиной и

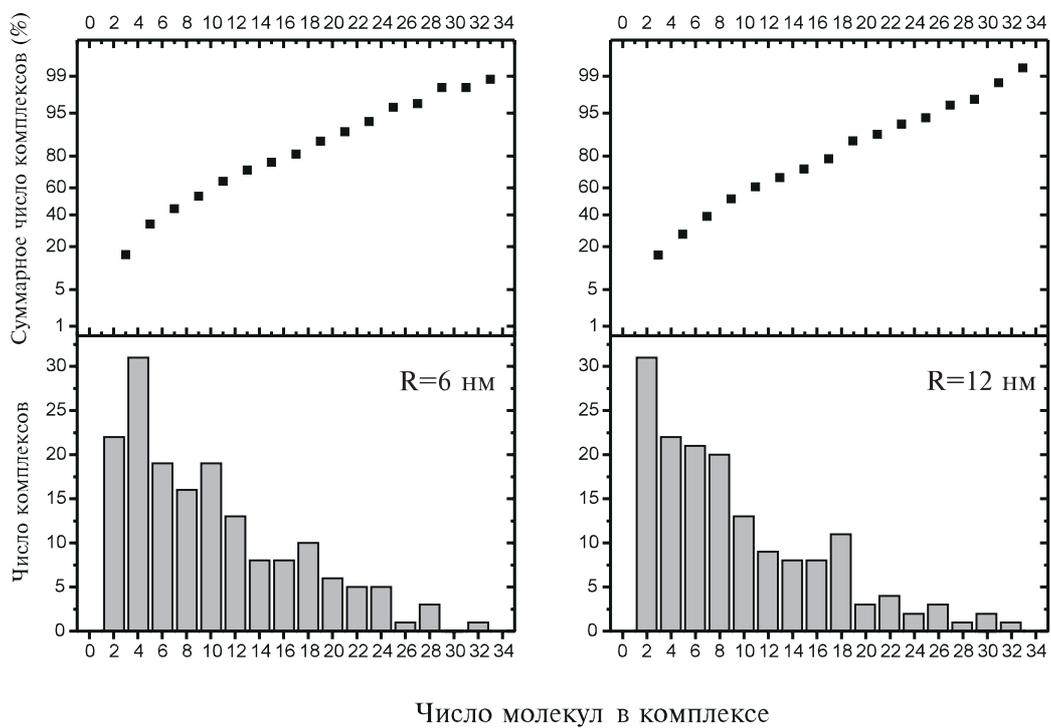


Рис. 3: Гистограммы распределения числа молекул ДНК, входящих в состав комплексов с ПАВ.

А. С. Андреевой (Химический факультет МГУ) за помощь при приготовлении образцов комплексов ДНК-ПАВ. Работа была поддержана РФФИ, проект №97-03-32778а.

Список литературы

- [1] C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold, R. Keller // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 22
- [2] H. G. Hansma, J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, P. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante, and P. K. Hansma // *Science*. 1992. V. 256. P. 1180
- [3] А. А. Бухараев, Д. В. Овчинников, А. А. Бухараева // *Заводская лаборатория*. 1997. №5. С. 10
- [4] V. J. Garcia, L. Martinez, J. M. Briceno-Valero, and C. H. Schilling // *Probe Microscopy*. 1998. V. 1. No 2. P. 117
- [5] Yu. F. Drygin, O. A. Bordunova, M. O. Gallyamov, I. V. Yaminsky // *FEBS letters*. 1998. V. 425. P. 217
- [6] А. С. Андреева, М. О. Галлямов, О. А. Пышкина, В. Г. Сергеев, И. В. Яминский, // *Журнал физической химии*. 1999. Т. 73. No.11. С. 2062

Quantitative methods for deconvolution of true topographical properties of object on the basis of measured AFM-images:

Part 2. Broadening effect

M. O. Gallyamov, I. V. Yaminsky

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