



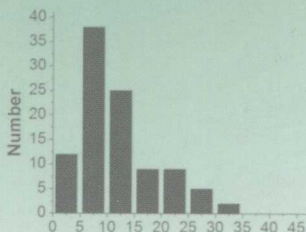
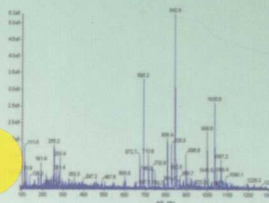
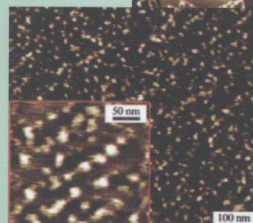
新世纪学术创新团队著作丛书

原子力显微镜在大分子研究中的应用

丛书主编 祖元刚

本书主编 祖元刚

著 者 刘志国 唐中华 祖元刚



科学出版社

013070082

Q71
06

内容简介

新世纪学术创新团队著作丛书

原子力显微镜在大分子研究中的应用

丛书主编：祖元刚

本书主编：祖元刚

著者：刘志国 唐中华 祖元刚



科学出版社

北京



北航

C1677905

Q71
06

内 容 简 介

近年来,原子力显微镜在多个科学领域的研究中得到了广泛应用。本书介绍了原子力显微镜的基本原理及它的各种用途,着重介绍了原子力显微镜在大分子(如DNA、蛋白质、多糖和胡敏酸)及它们形成的组装体结构和形貌研究方面的各种应用。书中介绍了各种大分子样品的制备和成像方法及它们所形成的各种新奇结构,为深入认识这些重要大分子的结构和功能提供了重要的参数。

本书是作者在此领域十多年研究成果的总结,其参考性、实用性和可操作性较强。本书可作为相关研究领域从业人员及高等院校本科生和研究生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

原子力显微镜在大分子研究中的应用/祖元刚主编. —北京:科学出版社, 2013. 8

(新世纪学术创新团队著作丛书)

ISBN 978-7-03-038457-7

I. ①原… II. ①祖… III. ①原子力学-显微镜-应用-生物大分子-研究
IV. ①Q71

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 202070 号

责任编辑:张会格 付 聪 / 责任校对:宣 慧

责任印制:赵德静 / 封面设计:王 浩

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京通州皇家印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年8月第一版 开本:B5(720×1000)

2013年8月第一次印刷 印张:13 1/4

字数:270 000

定价:68.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

丛书序言

自从宇宙大爆炸以来,自然天体即在介观的水平上,以夸克等粒子的随机碰撞为基本的能量运动形式,由介观向纳观、微观、中观、宏观、宇观方向,以运动的异质性为自然演化的源泉,以无限性的宇量规模演化成太阳系、地球、生命系统直至形成具有高度发达大脑的人类。

然而,人类直观认知自然界的视野仅限于宏观水平,对于从介观到宇观无限性与量规模的认知,人类也只能借助于各类观测工具由局部、定性、可数计量开始逐渐加深对自然界复杂性的认知,其间经历了数万年的发展历程,因而也推动着科学技术由定性研究到定量研究向智能研究,由单一学科到学科交叉向学科融合的方向发展,也规范着科学研究的行为由个体化向群体化方向发展。进入 20 世纪 90 年代,人类开始迅捷共享全球科技资源,科学研究的群体化整合进一步增强了科学家在整体观上全面认知自然界本质的凝聚力,因而酝酿着人类在 21 世纪通过学术团队创新来实现对自然界整体本质认知的重大突破。

我于 1972 年开始接触生命科学研究,1978 年开始从事生命科学研究,在大约 30 年的学术生涯中,逐渐认识到单一学科和个体化研究的局限性,为此,我于 1990 年开始,下决心以重点实验室的形式组建学术团队,发挥集体智慧的优势,试图将宏观研究与微观研究结合,来全面揭示生命系统与环境系统相互作用的内在机理。经过十几年的努力,我们的学术团队积累了一些原始创新性的研究成果,现以《新世纪学术创新团队著作丛书》的形式陆续刊出,以有利于自由探索式学术交流和集成发展。

祖元刚

2004 年 1 月于哈尔滨

序 言

大分子是指各种相对分子质量达到上万或更多的分子,主要为有机分子,它们一般由单体的简单分子单位所组成。在自然界和生物体内都存在着大量的大分子(如蛋白质分子、核酸、多糖和胡敏酸等),其中蛋白质是由各种氨基酸组成,核酸是由核苷酸为单元构成。与低相对分子质量的分子相比,高相对分子质量的大分子具有更复杂的二维和三维及各种多维的组装结构。经过大量的研究发现,大分子的自身结构及其组装结构往往与自然界中的一些重要自然过程及生命活性密切相关。因而,在单分子水平上研究大分子及其组装结构是深入认识这些重要的自然过程和生命活动的基础。

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)诞生于1986年,经过多年的发展,它已可用于在单分子水平上研究大分子及其组装结构。为了深入探索一些重要的生态过程及生命活动的本质,在我的大力倡导和支持下,我实验室较早购买了一台先进的多功能原子力显微镜,并引进刘志国副教授等组成研究团队,率先运用原子力显微镜对一些重要的生物大分子及其组装结构开展了大量的研究工作。我们的研究主要集中在DNA分子在不同基底表面成像和结构研究,特别是在高定向热解石墨表面观察到了几种不同寻常的DNA结构;对DNA和小分子相互作用开展了研究,特别对DNA凝集现象及DNA和药物小分子相互作用进行了重点研究;对绿色荧光蛋白、人体DNA拓扑异构酶I、壳聚糖及胡敏酸等大分子及其组装结构进行了深入研究。我们观察到了许多非同寻常的结构,取得了一些令人鼓舞的结果,运用相关的研究成果整理成论文并已发表,其中多篇已被SCI收录。同时,我们还培养了多名研究生。

本书是由我总体策划和组织,由刘志国副教授和唐中华副教授具体撰写而成,书中的部分结果源自于刘志国副教授的博士后出站报告《生物无机纳米材料的合成、构建和表征的研究》、博士论文《DNA和纳米结构的扫描探针显微学研究》。此外,本书还包括我们研究团队中张宇亮硕士的毕业论文《对苯二胺氧化产物与DNA相互作用研究》、梁慧丽硕士的毕业论文《顺铂与DNA体外相互作用的原子力显微镜研究》、孟荣华硕士的毕业论文《人体拓扑异构酶I和胡敏酸的原子力显微镜成像研究》、谭盛男硕士的毕业论文《壳聚糖形貌及包裹有顺铂的壳聚糖纳米粒子制备的研究》、赵琳硕士的毕业论文《DNA在HOPG表面吸附的AFM研究》,以及周振硕士的毕业论文《铂类药物与DNA体外相互作用的原子力显微镜研究》。为了反映在此领域的最新前沿,我们也精选介绍了国际上的一些最新的研究

前 言

大分子的自身结构及其组装结构往往与自然界中的一些重要自然过程及生命活动密切相关。例如,2m 长的双链 DNA 可包裹在人体细胞内直径为 $5\mu\text{m}$ 的核里,虽然经过了大量的研究,但 DNA 分子能形成有序结构的能力仍然处在探索阶段,因而从单分子水平上认识大分子及其组装结构是揭示一些重要自然过程和生命活动奥秘的重要基础。

原子力显微镜被认为是继光学显微镜和电子显微镜后的第三代显微镜,自 1986 年被发明后,经过各国科学家们的长期探索、改进和发展,已经成为了研究大分子的非常有力的工具。运用原子力显微镜已可对大分子实现单分子水平上的观察和研究,通过精确控制扫描探针施加的力和移动路径目前甚至可达到对单个大分子的操纵、切割和排列,因而原子力显微镜被认为是近年来新兴发展的纳米科技的眼和手。

与其他显微和结构分析手段相比,原子力显微镜对大分子的研究具有如下的特点:能够获得高分辨率的三维图像,可观察单个大分子及其分子内形成的微细结构,也可研究同种大分子间形成的组装结构,更重要的是可测定不同大分子间形成的组装结构,这点是现今的光谱结构表征方法(如核磁共振光谱和 X 射线晶体衍射法)难以直接研究的领域之一;可在液相环境下进行实时成像,因而可在生理条件下研究有大分子参与的复杂生理作用过程;可对大分子直接的操纵,获得单分子力谱,因而可研究大分子内及大分子间存在的重要力学参数,从而可以多角度地分析大分子的结构。当然,目前原子力显微镜在对大分子的研究中也存在着一些缺陷和不足,如成像速度还有待于进一步提高,以便实时地捕捉很快的作用过程;目前观察的范围一般不超 $100\mu\text{m}$ 的区域,因而有待于进一步的扩大;如何进一步减小针尖效应;等。令人欣喜的是,这些缺陷和不足正在被逐步地改善,如多探针及小悬臂的新型仪器正在被探索和研制中,因而扫描速度和成像范围有望得到大幅度地提升。

本书主要介绍了我们研究团队在近年来所取得的一系列研究成果,为了反映在此领域的最新前沿及丰富本书的内容,我们也精选介绍了国际上的一些最新的研究报道。本书是在我们研究团队共同努力下完成的,其中,祖元刚教授作为丛书和本书的主编,为本书的策划和组织付出了大量心血;我们研究团队中的研究生张宇亮、梁慧丽、孟荣华、谭盛男、赵琳和周振等对本书部分研究内容也做出了大量贡献,在此表示感谢!同时感谢国家林业公益性行业科研专项经费“目的林药组分资

源定向培育与高值化(20120460)”、中央高校基本科研业务费专项资金(DL12DA02)、“十二五”农村领域国家科技计划课题“杜仲和喜树珍贵材用和药用林定向培育关键技术与示范(2012BAD21B05)”、林业科学技术推广项目“黑龙江省重度盐碱地生态治理与植被恢复技术(研究)示范([2012]46号)”、林业公益性行业科研专项经费“松嫩平原重度盐碱地造林绿化研究(201104002-3)”等项目对本书的资助!

由于作者水平有限,本书在内容选择、观点阐述的深度和广度等方面难免会有不足之处,恳请各位专家和同仁不吝指正!

著者

2013年4月于哈尔滨

目 录

丛书序言	1
序言	1
前言	1
第 1 章 原子力显微镜概述	1
1.1 原子力显微镜的诞生	1
1.2 原子力显微镜与其他种类显微镜的对比	2
1.3 原子力显微镜的基本原理	4
1.3.1 原子力显微镜的基本成像模式	6
1.3.2 运用原子力显微镜可获得的其他成像信息	8
1.4 原子力显微镜的各种应用	11
1.4.1 成像应用	11
1.4.2 研究不同对象间的作用力	11
1.4.3 加工和操纵应用	13
参考文献	13
第 2 章 原子力显微镜在 DNA 分子研究中的应用	16
2.1 DNA 分子在云母表面的固定和成像	21
2.1.1 DNA 分子在云母表面的具体固定方法及实验操作	22
2.1.2 DNA 分子在云母表面成像的结果与讨论	24
2.2 DNA 分子在高定向热解石墨表面的固定和成像	32
2.2.1 DNA 分子在 HOPG 表面自由吸附成像的原子力显微镜研究	33
2.2.2 温度对 ssDNA 分子在 HOPG 表面自组装的影响	44
2.2.3 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 对 DNA 分子在 HOPG 表面成像影响的原子力显微镜研究	53
参考文献	62
第 3 章 DNA 分子和小分子相互作用的研究	69
3.1 原子力显微镜在 DNA 分子凝集现象研究中的应用	69
3.1.1 DNA 分子的凝集现象	69
3.1.2 原子力显微镜在 DNA 分子凝集研究中的应用概况	72
3.1.3 原子力显微镜在 DNA 分子凝集研究中的实例	73

3.2	原子力显微镜在 DNA 分子和药物小分子相互作用研究中的应用	82
3.2.1	顺铂的发现及其抗癌机制的研究进展	83
3.2.2	高浓度顺铂和 DNA 分子相互作用的原子力显微镜研究	87
3.2.3	低浓度顺铂和 DNA 分子作用的原子力显微镜研究	95
	参考文献	98
第 4 章	原子力显微镜在蛋白质结构及蛋白质组装体方面研究的应用	102
4.1	光合作用膜的本体结构研究	102
4.2	绿色荧光蛋白及其组装结构的研究	104
4.3	人体 DNA 拓扑异构酶 I 在气相和液相下在云母表面的原子力显微镜成像研究	114
	参考文献	125
第 5 章	原子力显微镜在糖类和其他分子组装体结构研究中的应用	129
5.1	不同条件下壳聚糖形貌图及其组装体的原子力显微镜研究	130
5.2	胡敏酸在石墨表面的吸附和结构研究	146
	参考文献	153
第 6 章	原子力显微镜在表面刻蚀、加工和分子操纵中的应用	157
6.1	扫描探针加工技术概述	158
6.1.1	运用原子力显微镜的机械加工技术	158
6.1.2	电加工刻蚀技术	163
6.1.3	纳米笔技术	164
6.1.4	基于扫描探针显微学的纳米操纵	166
6.2	运用原子力显微镜在云母表面加工出标记来对样品进行定位的研究	166
6.3	纳米粒子的搬动和 DNA 分子的切割研究	174
	参考文献	189
第 7 章	原子力显微镜在大分子力学性质研究中的应用	195
7.1	蛋白质折叠和展开研究	196
7.2	DNA 分子的力学性质研究	199
7.3	对其他大分子的研究	200
	参考文献	201

力显微镜(AFM)(Binnig et al., 1986),并发表了题目为“原子力显微镜”的科学论文(Binnig et al., 1986)。在这篇文章中他们描述了如何用一个底部黏有微小金刚石具有弹性的表面镀金的条板替代隧道探针,它就是第一台原子力显微镜中的悬臂。尽管这一台仪器仅仅被使用了几次,但它所得出的结果对科学研究却产生了巨大的影响。目前,这一台原子力显微镜被保留在伦敦的科学博物馆中。这台仪器是使用压电器件来驱动悬臂在样品表面进行扫描的,它在纵向位置上的变化是通过在其表面上安装的金属丝所产生的隧道电流来测定的,整合得到扫描数据后即可得到样品的表面高度形貌图。在此基础上, Binnig 等接着提出了用振动的悬臂在样品表面扫描来获得更好成像的构想,这便是后来广泛应用的原子力显微镜敲击模式的雏形。时至今日,在原子力的成像中已不必使用黏有金刚石的悬臂,而是改用可方便地获得的各种基于微加工技术生产的商品化的硅和氮化硅探针。

原子力显微镜的出现,使得在原子水平上探测绝缘物质的表面高度形貌图成为了可能,而且它还可用于表面弹性、塑性、硬度、摩擦力等性质的研究,从而大大丰富了对微观世界的探测能力。其后,陆续出现了侧向力显微镜、磁力显微镜(Babcock et al., 1995)、力调制显微镜、化学力显微镜、扫描电化学显微镜、扫描电容显微镜(Dreyer and Wiesendanger, 1995)、扫描热显微镜(Nakabeppu et al., 1995)、扫描近场光学显微镜(Heinzelmann and Pohl, 1994)等。由于它们都是以微小的探针来“摸索”世界,故统称为扫描探针显微镜(scanning probe microscopies, SPM),并逐渐发展成为一门崭新的学科——扫描探针显微学。在众多的扫描探针显微镜中,以扫描隧道显微镜和原子力显微镜的应用最为普及。本文将原子力显微镜为主,介绍原子力显微镜在大分子研究领域的各种最新的应用和进展。

1.2 原子力显微镜与其他种类显微镜的对比

原子力显微镜和其他传统的显微镜(如光学显微镜、扫描电子显微镜和透射电子显微镜)在横向扫描尺度上的对比如图 1-1 所示。原子力显微镜最大的优点在于它能够获得三维图像。它的一个明显的局限性在于不能测量超过 $100\ \mu\text{m}$ 的区域,这是因为原子力显微镜是通过探针机械地扫描样品表面,扫描大的区域会需要相当长的时间。为了克服这一缺陷,多探头平行扫描和快速扫描方法正在被研究探索中。光学显微镜的观察尺度范围和原子力显微镜的观察尺度范围有着一个很好的重叠区域。因而,原子力显微镜经常和光学显微镜结合使用,通过两者的结合能够研究从毫米到纳米尺度对象。在实际的使用中,通常使用普通光学显微镜的观察去选择原子力显微镜的扫描区域。高分辨率的光学显微镜(通常与荧光显微镜整合)与原子力显微镜的结合具有许多的优点,特别是在生物学的研究中能够

得到体现。由于原子力显微镜的体积较小,故它和其他显微镜的结合比较容易实现。

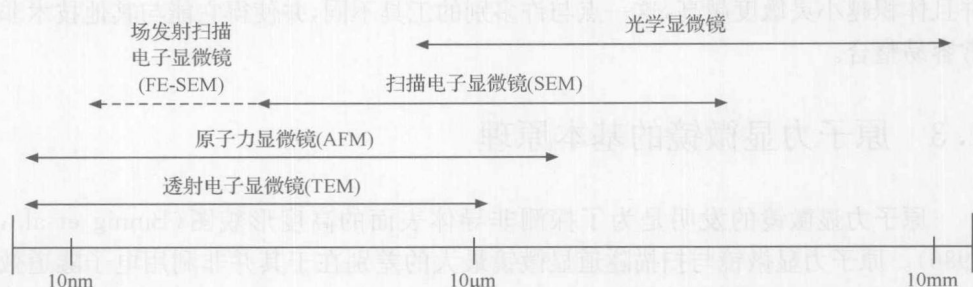


图 1-1 不同类型显微镜的应用尺度比较

原子力显微镜与扫描电子显微镜及透射电子显微镜在各方面的比较如表 1-1 所示。这几种显微技术的应用尺度范围较为接近,扫描电子显微镜的最高分辨率通常要比原子力显微镜低一些,而透射电子显微镜的最高分辨率与原子力显微镜较为接近。通常,原子力显微镜仪器比电子显微镜更加地简单小巧,并且扫描样品的制备比较容易,基本上任何样品都可用原子力显微镜进行观察。在原子力显微镜的使用中,如果探针的状况较好的话,一般能够得到很好的图像。在透射电子显微镜和扫描电子显微镜的使用中,一般需要真空环境并且要求样品能够导电(不导电样品在成像前需要镀一层金属膜)。因而原子力显微镜的优点在于在空气环境中成像前样品不需要经过前处理,这就意味着在原子力显微镜中样品能够及时用于成像,并且能够避免在真空和镀膜过程中引入各种假象。原子力显微镜在扫描成像的过程中,一般要比扫描电子显微镜花费更长的时间,特别是当同一样品上有许多观察对象时更为明显。

表 1-1 原子力显微镜与扫描电子显微镜和透射电子显微镜在各方面的比较

	原子力显微镜	扫描电子显微镜	透射电子显微镜
适用样品类型	导电或绝缘	导电	导电
适用成像环境	空气,液相,真空	真空或气体 (FE-SEM)	真空
分辨率/nm	0.1	5	0.1
适用最大样品尺寸	无限制(一般为厘米级)	30mm	2mm
测量维度	三维	二维	二维
成像时间/min	2~5	0.1~1	0.1~1
相对价格	相对便宜	中等	较高

原子力显微镜除了能够用于成像外还有许多其他的用途。原子力显微镜的一

大优点是它的探针能够精确地定位或接近样品的表面, 这为对样品进行在纳米尺度上测定和操作提供了可能。原子力显微镜的另外一个优点是灵敏度高, 体积小, 并且体积越小灵敏度越高, 这一点与许多别的工具不同, 并使得它能与其他技术非常容易整合。

1.3 原子力显微镜的基本原理

原子力显微镜的发明是为了探测非导体表面的高度形貌图(Binnig et al., 1986)。原子力显微镜与扫描隧道显微镜最大的差别在于其并非利用电子隧道效应, 而是利用原子之间的范德华力(Van Der Waals force)作用来呈现样品的表面特性。

假设两个原子中, 一个是在悬臂(cantilever)的探针尖端, 另一个是在样品的表面, 它们之间的作用力会随距离的改变而变化, 其作用力与距离的关系如图 1-2 所示, 当原子与原子很接近时, 彼此电子云的斥力作用大于原子核与电子云之间的吸引力, 所以整个合力表现为斥力的作用, 反之若两原子分开一定距离时, 其电子云的斥力作用小于彼此原子核与电子云之间的吸引力, 整个合力表现为吸引力作用。从能量的角度来看, 这种原子与原子之间的距离与彼此之间能量的大小也可从伦纳德-琼斯(Lennard-Jones)公式中得到印证。

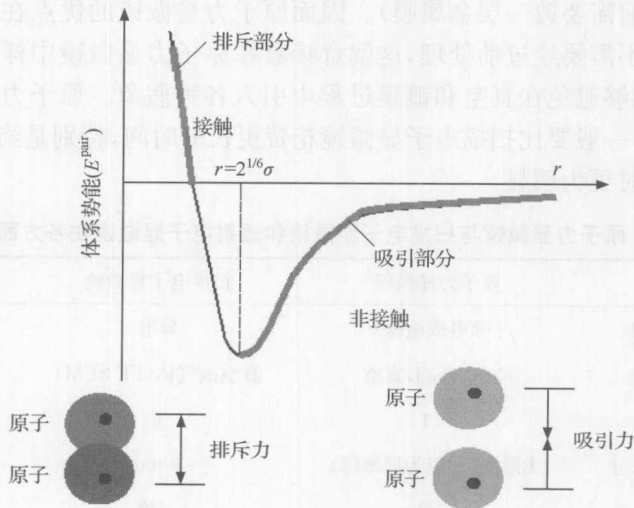


图 1-2 原子与原子之间的相互作用力和势能与原子之间距离的关系
 r 为原子之间的距离; σ 为势能为零时原子间的距离

$$E^{\text{pair}}(r) = 4\epsilon\left[\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6\right] \tag{1-1}$$

式中, E^{pair} 为体系势能; r 为原子之间的距离; ϵ 为势能阱深度; σ 为势能为零时原子间的距离。

从式(1-1)中可知, 当 r 降低到某一程度时其能量为 $+E$, 代表了在空间中两个原子是相当接近且能量为正值, 若假设 r 增加到某一程度时, 其能量就会为 $-E$, 同时也说明空间中两个原子之间的距离相当远且能量为负值。不管从空间上看两个原子之间的距离与其所导致的吸引力和斥力还是从当中能量的关系来看, 原子之间存在着奇妙的相互作用。原子力显微镜就是利用原子之间这种奇妙的关系来把原子的样子给呈现出来, 让微观世界不再神秘。原子力显微镜是利用微小探针与待测物之间交互作用力, 来呈现待测物表面的物理特性。

原子力显微镜扫描成像的基本原理: 将一个对微弱力极敏感的微悬臂一端固定, 另一端为一微小的针尖, 使针尖与样品表面轻轻接触, 利用针尖尖端原子与样品表面原子间的极微弱的排斥力, 并在扫描时通过控制这种力的恒定, 带有针尖的微悬臂将对应于针尖与样品表面原子间作用力的等位面而在垂直于样品表面的方向作起伏运动, 然后利用光学检测法或隧道电流检测法, 可测得微悬臂对应于扫描各点的位置变化, 从而获得样品表面高度形貌图的信息。下面, 我们以激光检测原子力显微镜 (atomic force microscope employing laser beam deflection for force detection, Laser-AFM)——扫描探针显微镜家族中最常用的一种为例, 来详细说明原子力显微镜的工作原理。

如图 1-3 所示, 激光器 (laser diode) 发出的激光束经过光学系统聚焦在微悬臂 (cantilever) 背面, 并从微悬臂背面反射到由光电二极管构成的激光检测器 (detector)。在扫描样品时, 由于样品表面的原子与微悬臂探针尖端的原子间的相互作用, 微悬臂将随样品表面高度形貌图而弯曲起伏, 因而其表面的反射光束也将随之变化, 通过光电二极管可检测到反射光束光斑位置的变化, 将这个代表微悬臂弯曲的形变信号反馈至电子控制器驱动的压电扫描器, 通过调节其垂直方向的电压, 使扫描器在垂直方向上伸长或缩短, 从而调整针尖与样品之间的距离, 使微悬臂弯曲的形变量在扫描过程中维持不变, 也就是使探针—样品间的作用力保持不变。在上述的反馈控制机制下, 记录扫描器在垂直方向上的位移, 就能获得被测样品表面高度形貌图的信息。

在系统检测成像全过程中, 探针和被测样品间的距离始终保持在纳米 (10^{-9} m) 量级, 距离太大不能获得样品表面的信息, 距离太小会损伤探针和被测样品。而反馈 (feedback) 回路的作用就是在工作过程中, 由探针得到探针—样品相互作用的强度, 来改变加在样品扫描器垂直方向的电压, 从而使样品伸缩, 调节探针和被测样品间的距离, 反过来控制探针—样品相互作用的强度, 实现反馈控制。

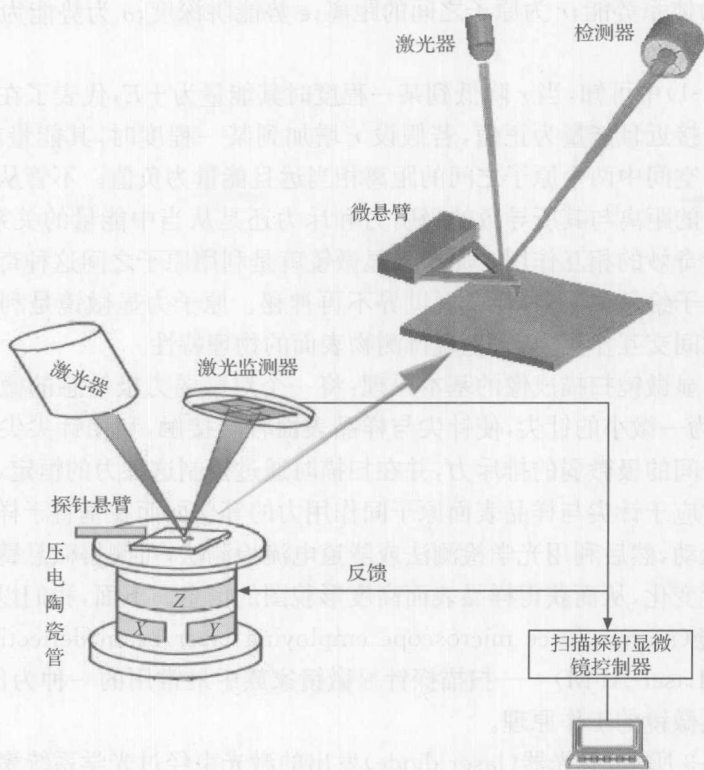


图 1-3 原子力显微镜扫描成像原理

1.3.1 原子力显微镜的基本成像模式

依据针尖和样品之间接触程度的不同原子力显微镜成像模式可分为接触式成像模式(contact imaging mode)、轻敲式成像模式(tapping imaging mode)、非接触式成像模式(non-contact imaging mode)。

1.3.1.1 接触式成像模式

接触式成像模式是原子力显微镜最先采用也是分辨率最高的一种模式。在这种成像模式中,原子力显微镜的探针与样品表面进行“轻接触”。将一个对微弱力极敏感的微悬臂的一端固定,另一端为一微小的针尖,针尖与样品表面轻轻接触。在探针逐渐接近样品表面时,探针尖端的表面原子与样品表面原子由相互吸引,直至原子之间电子云产生静电排斥力为止。这种静电排斥力随着探针针尖和样品表面原子的进一步靠近而逐渐增大,最后抵消原子间的范德华引力。当原子间的距离接近或小于 1nm,约为化学键长时,合力为零。当合力为正值时(此时主要为静

电排斥力),原子相互接触。由于针尖尖端原子与样品表面原子间存在极微弱的排斥力($10^{-8} \sim 10^{-6} \text{N}$),并且样品表面起伏不平而使探针带动微悬臂弯曲变化,而微悬臂的弯曲又使光路发生变化,进而使反射到激光位置检测器上的激光光点上下移动,由表面高度形貌图引起的微悬臂形变量大小可通过计算激光束在检测器4个象限中的强度差值 $[(A+B)-(C+D)]$ 得到,检测器将光点位移信号转换成电信号并经过放大处理。将这个代表微悬臂弯曲的形变信号反馈至电子控制器驱动的压电扫描器,调节垂直方向的电压,使扫描器在垂直方向上伸长或缩短,从而调整针尖与样品之间的距离,使微悬臂弯曲的形变量在水平方向扫描过程中维持不变,也就是使探针一样品间的作用力保持不变。在此反馈机制下,记录垂直方向上扫描器的位移及水平位置数据后得到样品的三维高度形貌图。

如果所选探针的弹性常数很小,悬臂容易发生弯曲并对样品的作用力小,可以不损坏样品而获取样品的表面高度形貌图信息。假如选择弹性系数大的针尖对样品表面施加较大的作用力,针尖就会使样品表面发生形变甚至破坏样品表面,甚至可以对样品表面进行加工。除范德华作用力外,在接触式原子力显微镜中还经常遇到针尖与样品表面的毛细作用力。在大气条件下,针尖及样品表面容易吸附一薄层水膜,由于毛细作用,这层水膜可产生约为 10^{-8}N 的较强吸引力使探针针尖与样品表面黏合在一起。需要指出的是,当样品在液相或高真空条件下成像时,接触式原子力显微镜中的毛细作用力几乎可忽略不计。接触式原子力显微镜能够获得样品表面的精细结构信息,但由于表面毛细作用力及摩擦力的存在,对软样品可能会产生拖动和破坏,因而此模式不太适合于考察软样品(如生物样品),但比较适合于硬材料样品表面的表征。

1.3.1.2 轻敲式成像模式

用一个小压电陶瓷元件驱动微悬臂振动,其振动频率恰好高于探针的最低机械共振频率($\sim 50 \text{kHz}$)。由于探针的振动频率接近其共振频率,因此它能对驱动信号起放大作用。当把这种受迫振动的探针调节到样品表面时(通常 $2 \sim 20 \text{nm}$),探针与样品表面之间会产生微弱的吸引力。在半导体和绝缘体材料上的这一吸引力,主要是凝聚在探针尖端与样品间水的表面张力和范德华吸引力。虽然这种吸引力比在接触模式下记录到的原子之间的斥力要小一千倍,但是这种吸引力也会使探针的共振频率降低,驱动频率和共振频率的差距增大,探针尖端的振幅减少。这种振幅的变化可以用激光检测法探测出来,从而可推出样品表面的起伏变化。

当探针经过表面隆起的部位时,吸引力最强,其振幅变小;而经过表面凹陷处时,其振幅增大,反馈装置根据探针尖端振动情况的变化而及时改变加在Z轴压电扫描器上的电压,从而使振幅(也就是使探针与样品表面的间距)保持恒定。同扫描隧道显微镜和接触模式原子力显微镜一样,轻敲式成像模式原子力显微镜是

用 Z 驱动电压的变化来表征样品表面的起伏图像。

在该模式下,扫描成像时针尖对样品进行“敲击”,两者间只有瞬间接触,克服了传统接触模式下因针尖拖过样品而受到摩擦力、黏附力、静电力等的影响,并有效地克服了扫描过程中针尖划伤样品的缺点,适合于柔软或吸附样品的检测,特别适合检测生物样品,如核酸、蛋白质、细胞和病毒等。

1.3.1.3 非接触式成像模式

非接触式原子力显微镜中,探针尖和样品表面有一定的间隔,一般为几纳米到几十纳米,这在范德华曲线上位于非接触区域。探针在接近其共振频率处在样品表面附近振动。在非接触式原子力显微镜中,探针尖和样品作用力通常在 10^{-12} N 左右。当针尖接近样品表面时,探针共振频率或振幅会发生改变。检测系统探知此变化后,把信号传递给反馈系统,反馈系统通过控制压电陶瓷管的伸缩来保持探针针尖共振频率或振幅不变,从而控制探针针尖与样品表面的平均距离不变。记录系统通过记录压电陶瓷管的伸缩情况获取样品表面的高度形貌图特征。非接触式成像模式原子力显微镜由于探针尖不和样品表面接触,不会破坏样品表面,适于对软样品的考察。由于针尖和样品的作用力比较弱,这种成像模式分辨率较低,不能获取样品精细高度形貌图。

1.3.2 运用原子力显微镜可获得的其他成像信息

在原子力显微镜的应用中,最常使用的成像是高度成像,即高度形貌图成像,除此以外还能获得其他的一些成像信息。

1.3.2.1 摩擦力显微镜

摩擦力显微镜(LFM)是在原子力显微镜表面高度形貌图成像基础上发展出来的一种成像技术。材料表面上不同组分很难在高度形貌图像中区分开来,而且污染物也有可能覆盖样品的真实表面。摩擦力显微镜恰好可以研究那些高度形貌图上相对较难区分、而又具有相对不同摩擦特性的多组分材料表面。

图 1-4 为摩擦力显微镜扫描及力检测的示意图。在一般的接触模式原子力显微镜中,探针在样品表面以 X、Y 光栅模式扫描(或样品在探针下扫描)。聚焦在微悬臂上的激光反射到光电检测器,由表面高度形貌图引起的微悬臂形变量大小是通过计算激光束在检测器 4 个象限中的强度差值 $[(A+B)-(C+D)]$ 得到的。反馈回路通过调整微悬臂高度来保持样品上作用力恒定,也就是微悬臂形变量恒定,从而得到样品表面上的三维高度形貌图像。而在横向摩擦力技术中,探针在垂直于其悬臂方向上扫描。检测器根据激光束在 4 个象限中的强度差值 $[(A+C)-(B+D)]$ 来检测微悬臂的扭转弯曲程度。微悬臂的扭转弯曲程度随表面摩擦特