

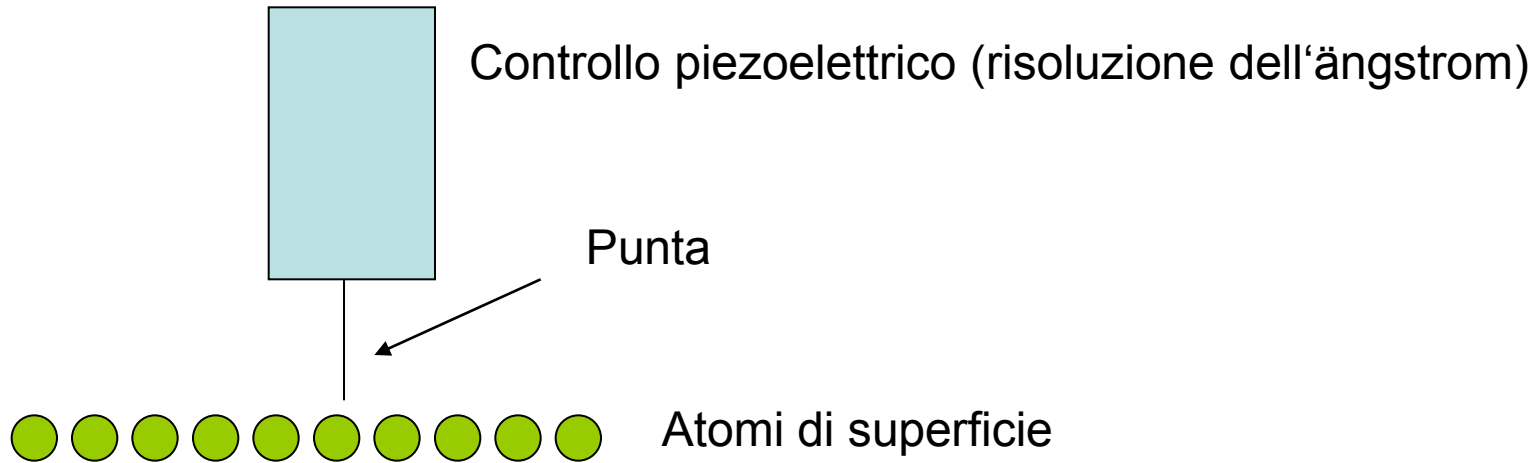
AFM : Atomic Force Microscopy

Microscopia a forza atomica



**An AFM scanning head
from Digital Instruments.**

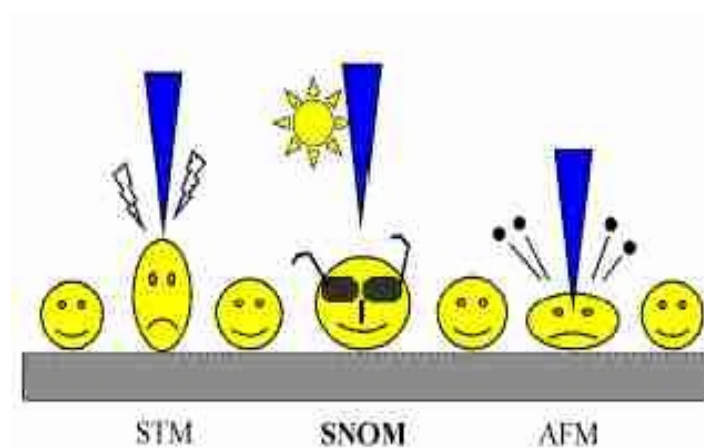
Tecniche di scanning probe (SPT) (sonda a scansione)



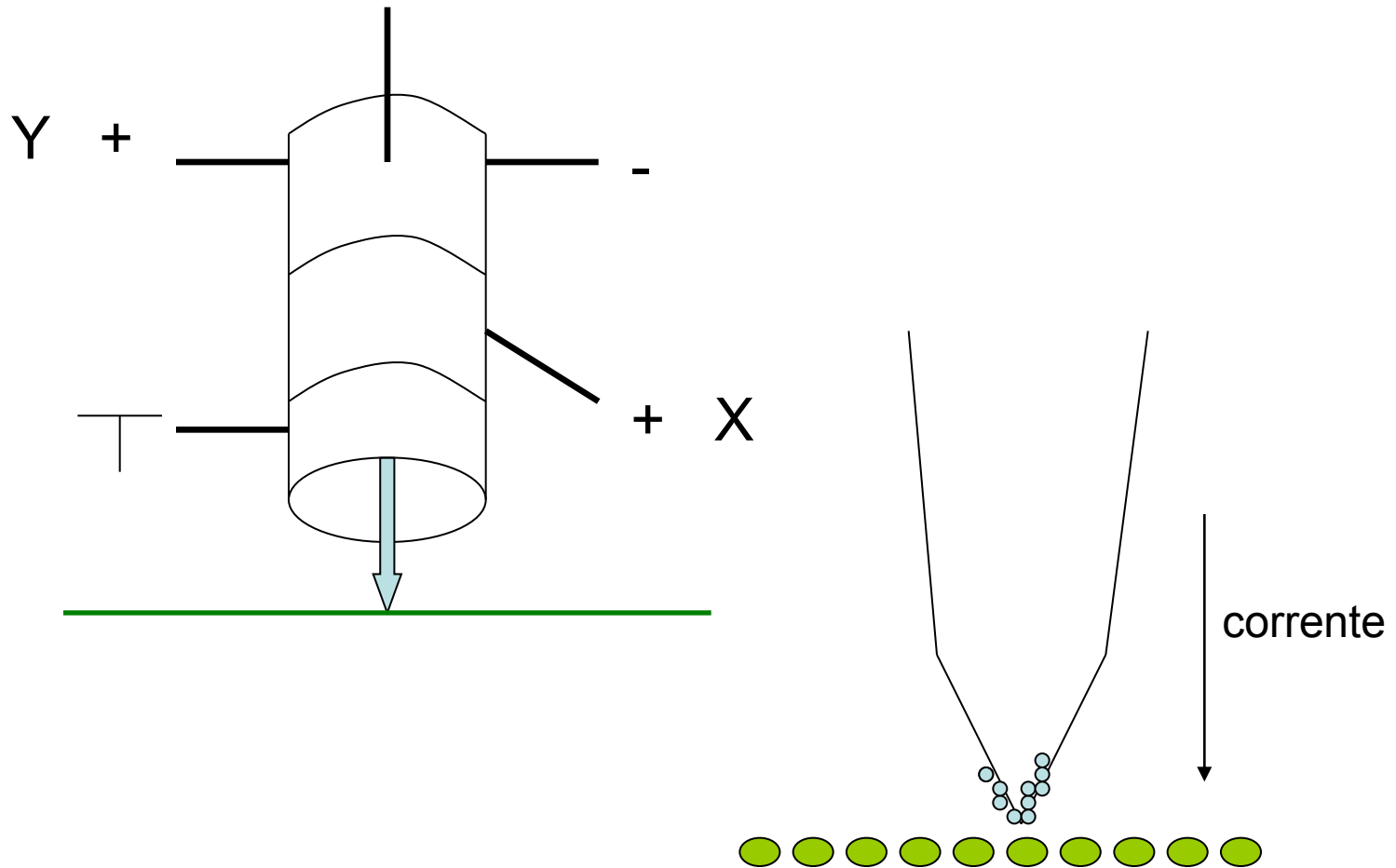
Principio generale: Un sonda viene passata sul campione registrando un segnale (come la corrente)

Tipi di tecniche di sonda a scansione (SPT)

- Microscopia tunnelling a scansione (STM)
- Microscopia a forza atomica (AFM)
- Microscopia di campo a scansione (SNOM)



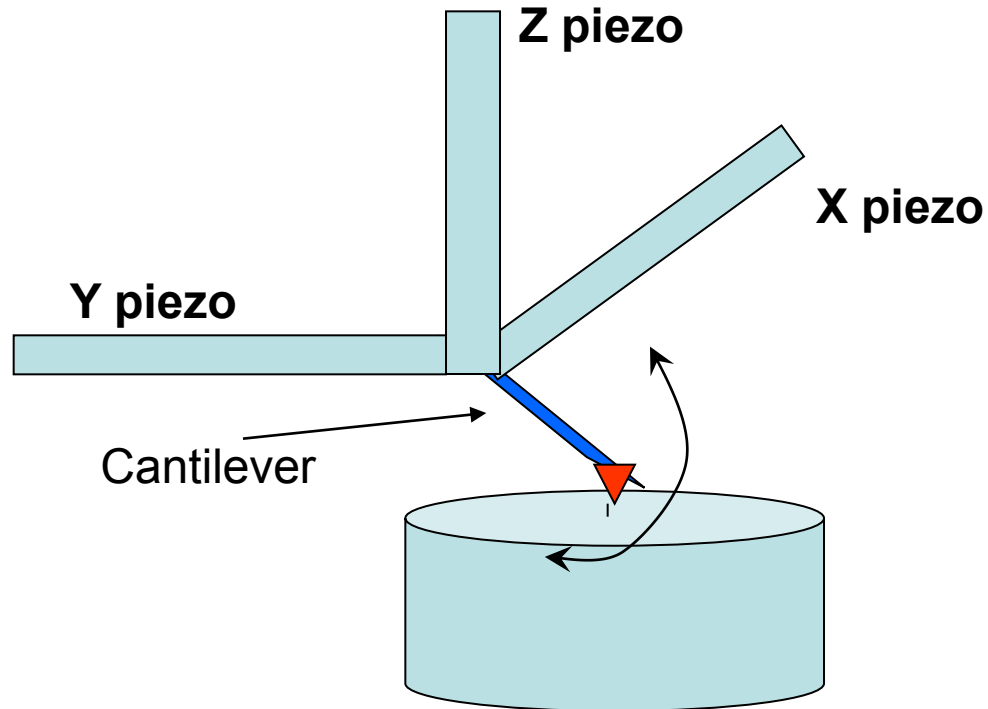
Scanning Tunnelling Microscopy



Svantaggio: non funziona con gli isolanti

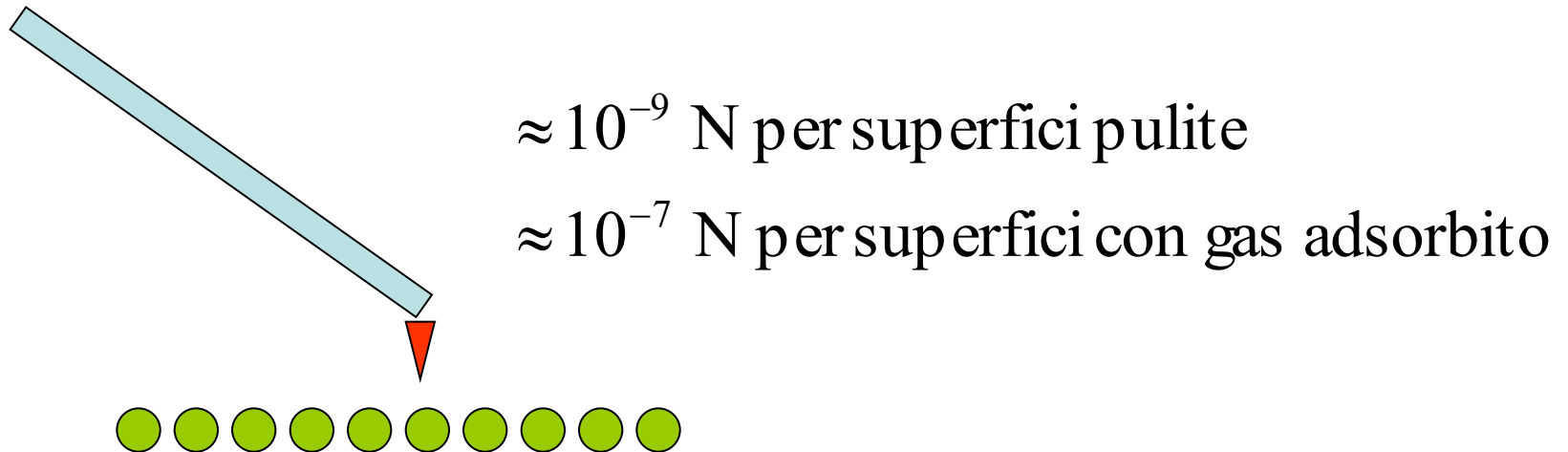
Atomic Force Microscopy (AFM)

Microscopio a Forza Atomica



Microscopia a forza atomica

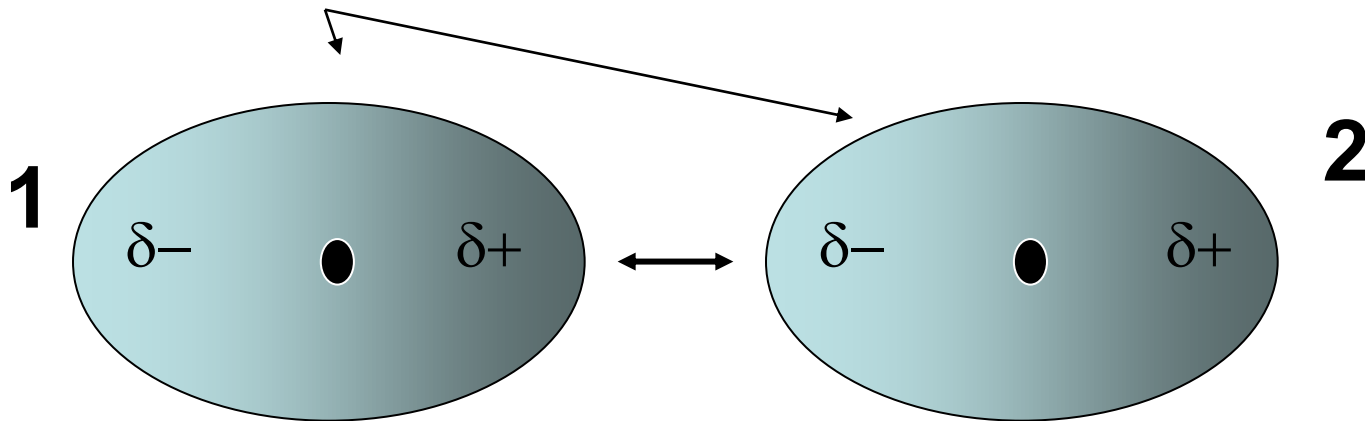
- La punta è posizionata da braccetti piezoelettrici
- Nessuna corrente passa dalla punta al campione
- Forze di superficie attraggono o allontanano la punta dal campione
- Il cantilever si piega
- Il piegamento del cantilever viene misurato (per esempio con un laser)
- La tecnica può funzionare in diversi modi



Forze di Van Der Waals

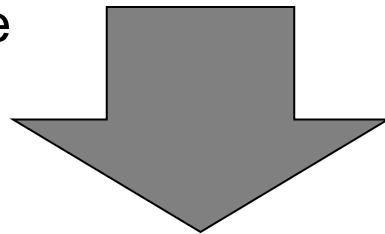
Forze di Van Der Waals

Due atomi elettricamente neutri con shell chiuse:



Dipolo temporaneo
risultante dalla fluttuazione
quantistica

Dipolo indotto, dovuto
alla presenza dell'altro
dipolo



Attrazione

Forze di Van Der Waals

Forza di London (1937) → dipolo indotto

$$E = -3I \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{r^6}$$

α = polarizzabilità

E' una diretta conseguenza della meccanica quantistica.

Equazione di Schroedinger:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \psi(x, t) + V(x, t) \psi(x, t) = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(x, t)$$

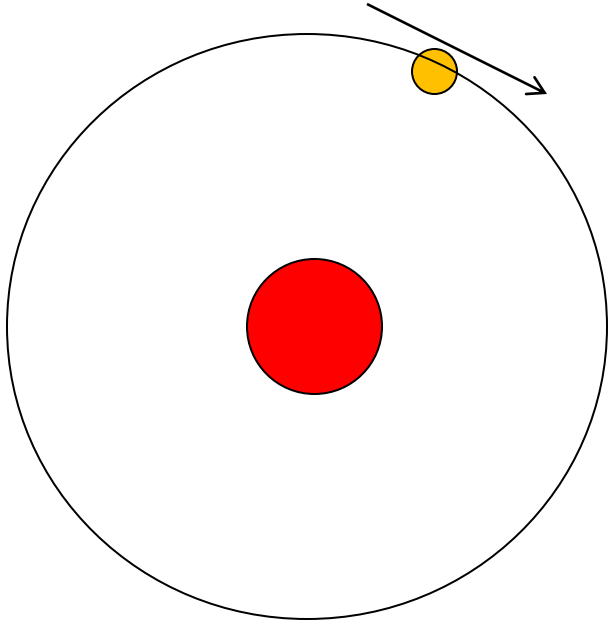
$$E = E_c + V = \frac{1}{2} m v^2 + V$$

$$V = k \frac{Qq}{r}$$

$$V = mgh$$

$$V = ?$$

Molecola di Idrogeno



$$-i\frac{\hbar}{2m}\frac{\partial}{\partial t}\psi = -\frac{\hbar^2}{2m}\frac{\partial^2}{\partial x^2}\psi - \frac{e^2}{r}\psi$$

Nel caso specifico:

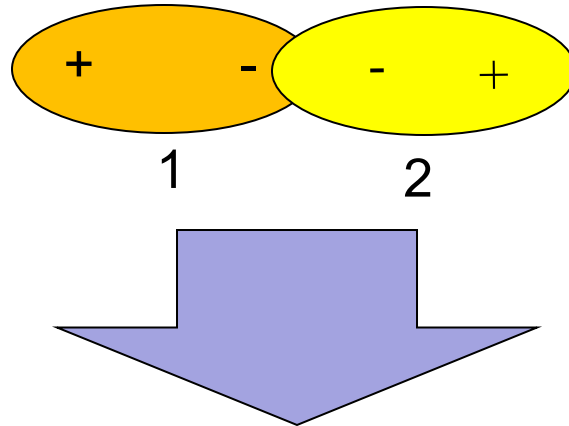
$$E = E_0 + V$$

$$E_0 = -\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial}{\partial x_1^2} + \frac{\partial}{\partial x_2^2} \right) - \frac{e^2}{r_1} - \frac{e^2}{r_2}$$

$$V = \frac{e^2}{r} + \frac{e^2}{|r + r_2 - r_1|} - \frac{e^2}{|r + r_2|} - \frac{e^2}{|r - r_1|}$$

Forze di Van Der Waals

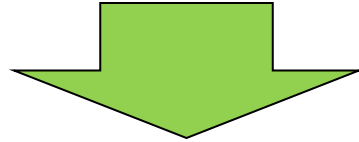
Se le molecole vengono a trovarsi troppo vicine l'una all'altra, si origina una forza repulsiva dovuta alla sovrapposizione delle nuvole elettroniche



$$V_{\text{rep}} = \frac{A}{r^{12}}$$

Forze di Van Der Waals

Il debole legame che si instaura fra molecole neutre in virtù delle forze attrattive fra dipoli istantanei



Legame di Van der Waals.

$$V_{\text{att}} = -\frac{B}{r^6}$$

La distanza di contatto fra atomi oltre la quale si sviluppano forze repulsive

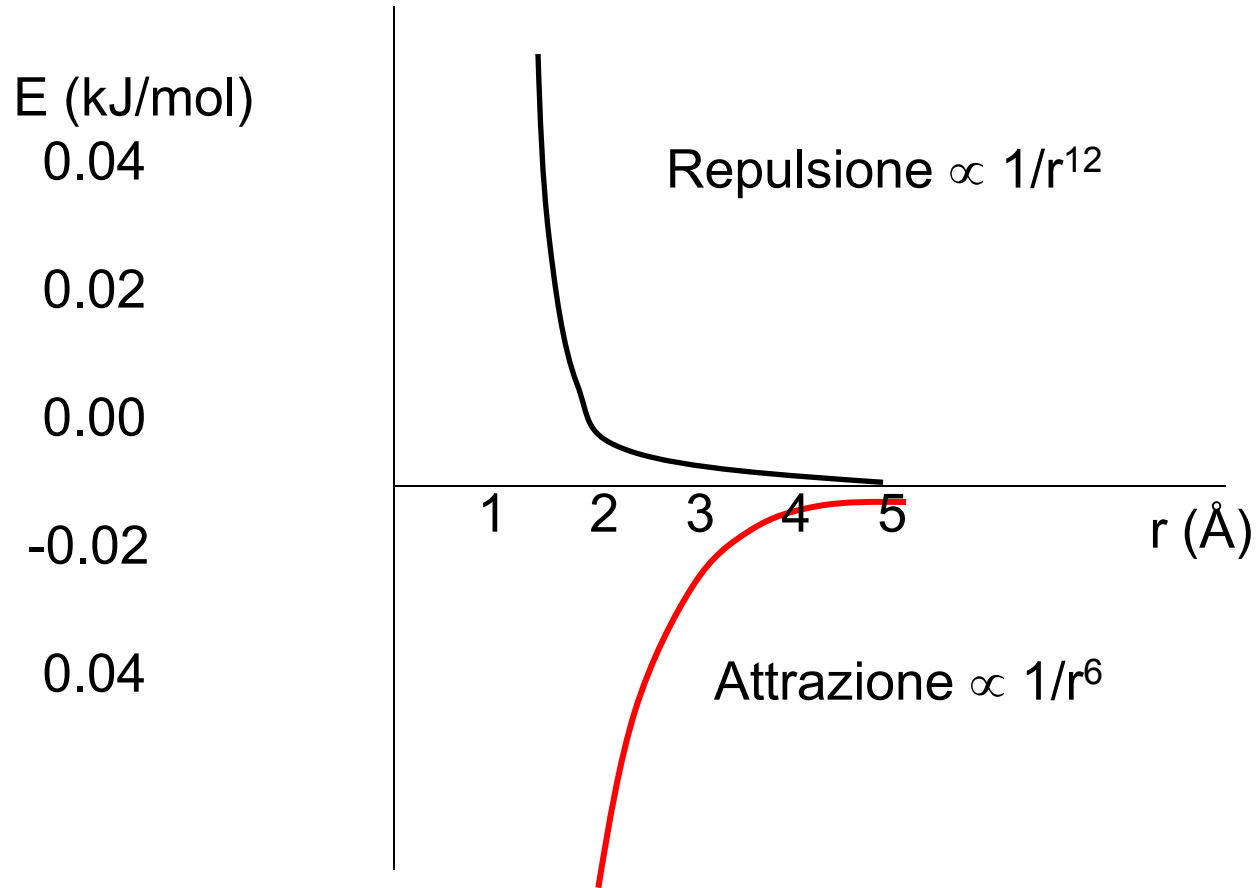


Distanza di Van der Waals.

$$V_{\text{rep}} = \frac{A}{r^{12}}$$

Le energia di questo tipo di interazioni vanno da circa 0.1 a 1-2 kJ/mol per **coppia di atomi**

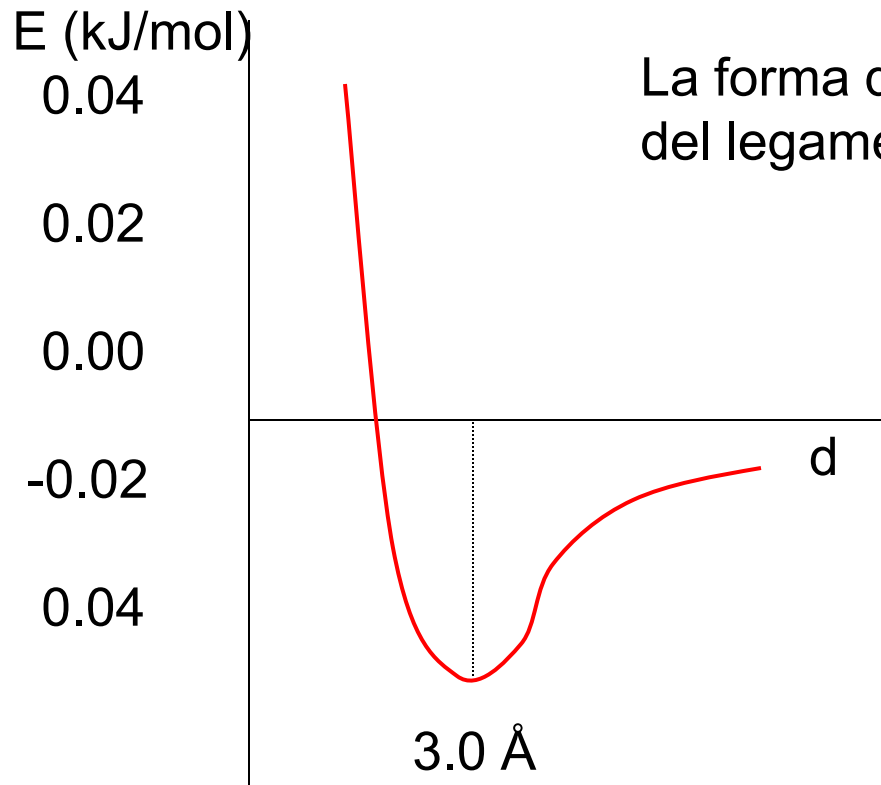
Forze di Van Der Waals



Forze di Van Der Waals

Curva di energia potenziale relativa al contatto di due atomi di He.

La forma della curva è la stessa di quella del legame covalente,

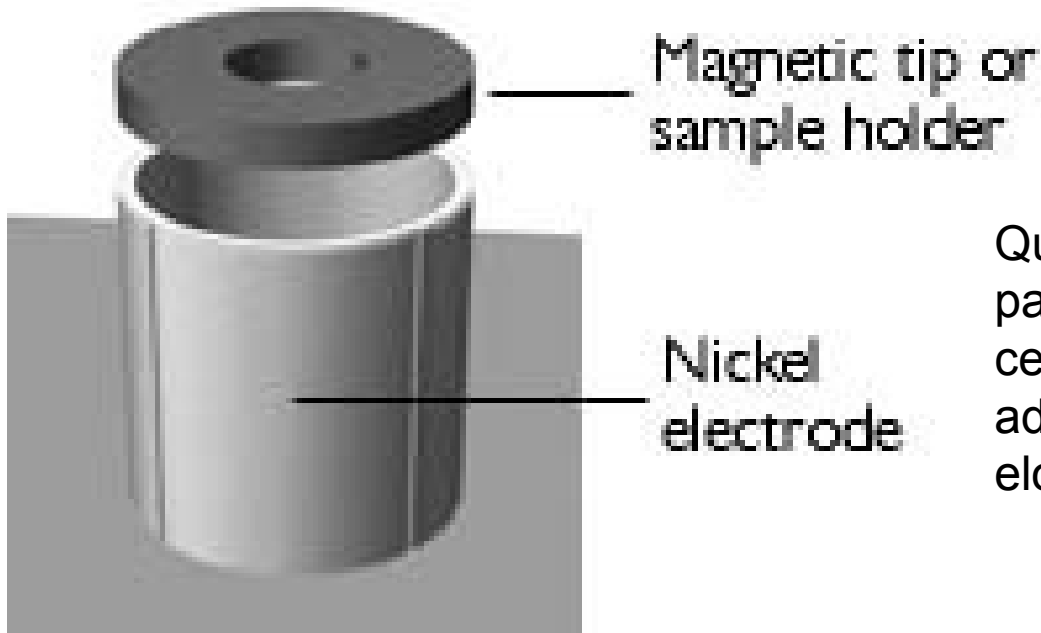


$$V = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6}$$

Ceramiche piezoelettriche

Ceramiche piezoelettriche sono una classe di materiali che si espandono o si contraggono in presenza di un gradiente di voltaggio tra un capo e l'altro.

Viceversa se subiscono una contrazione o un'espansione generano un gradiente di voltaggio

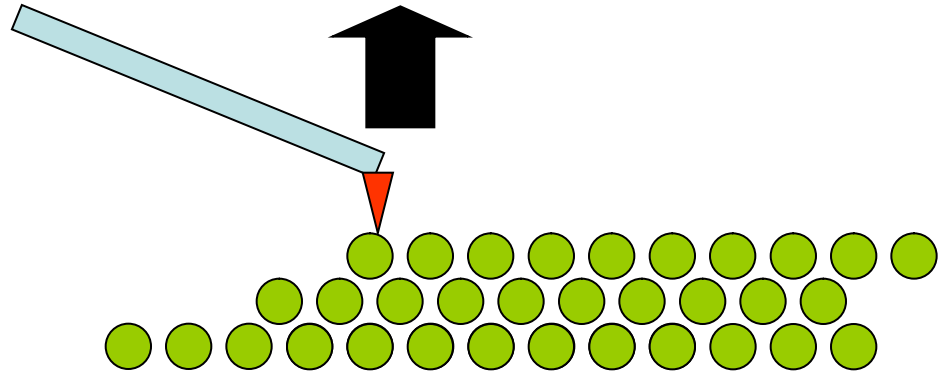


Quattro elettrodi sono attaccati alle pareti del tubo piezoelettrico ceramico, applicando un voltaggio ad uno degli elettrodi si stira o allunga il tubo piezoelettrico.

Microscopia a forza atomica

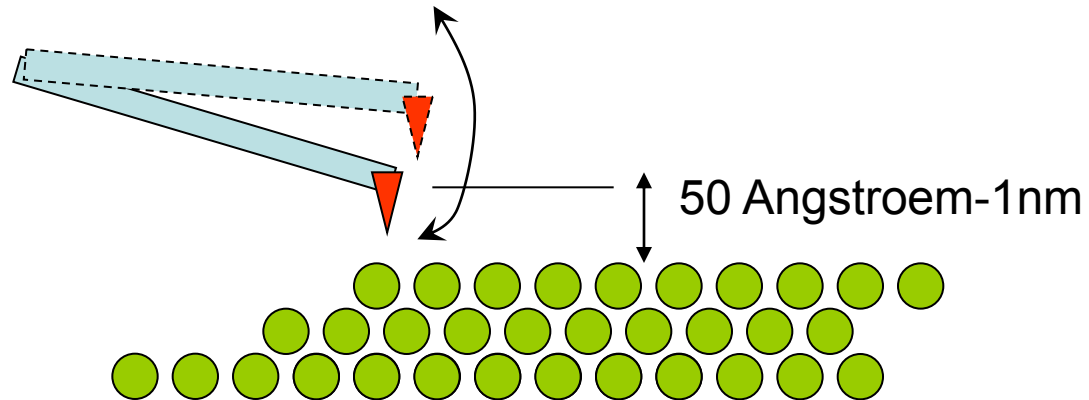
Modi di funzionamento:

Modo di contatto:



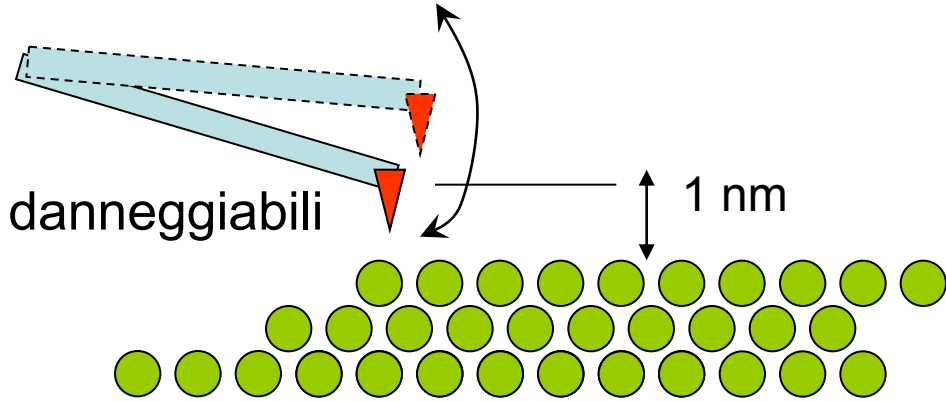
Modo di non-contatto:

Sensibile a strati di gas adsorbito
o altri tipi di strati



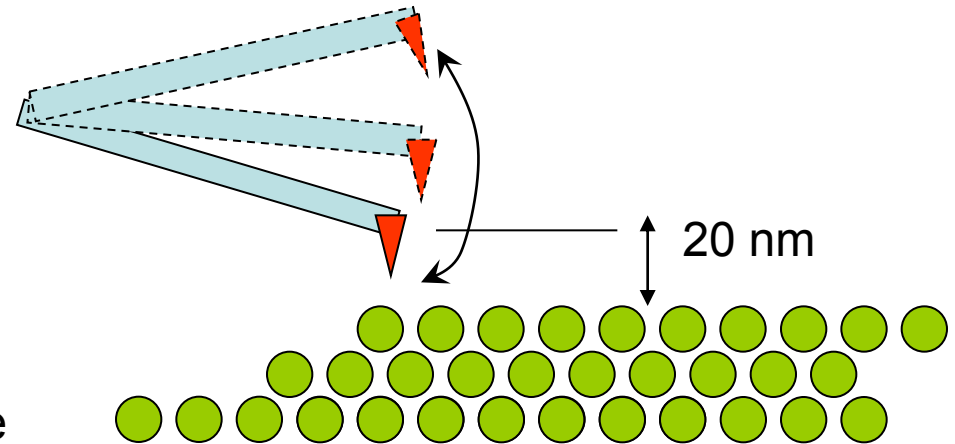
Modo di non-contatto

- Utile nel caso di superfici facilmente danneggiabili o contaminabili
- La sonda oscilla sulla superficie (fuori dalla frequenza di risonanza)
- La punta vibra e si registra la differenza della forza vicino o lontano dalla superficie
- La punta non tocca mai la superficie
- La superficie deve essere pulita e non contaminata
- Minore risoluzione laterale rispetto al modo di contatto



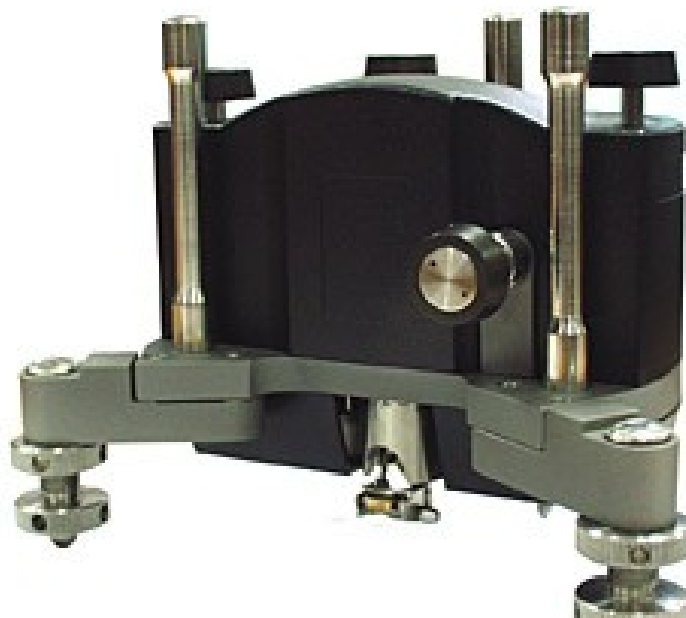
Tapping mode (“colpetto”) Modo contatto intermittente

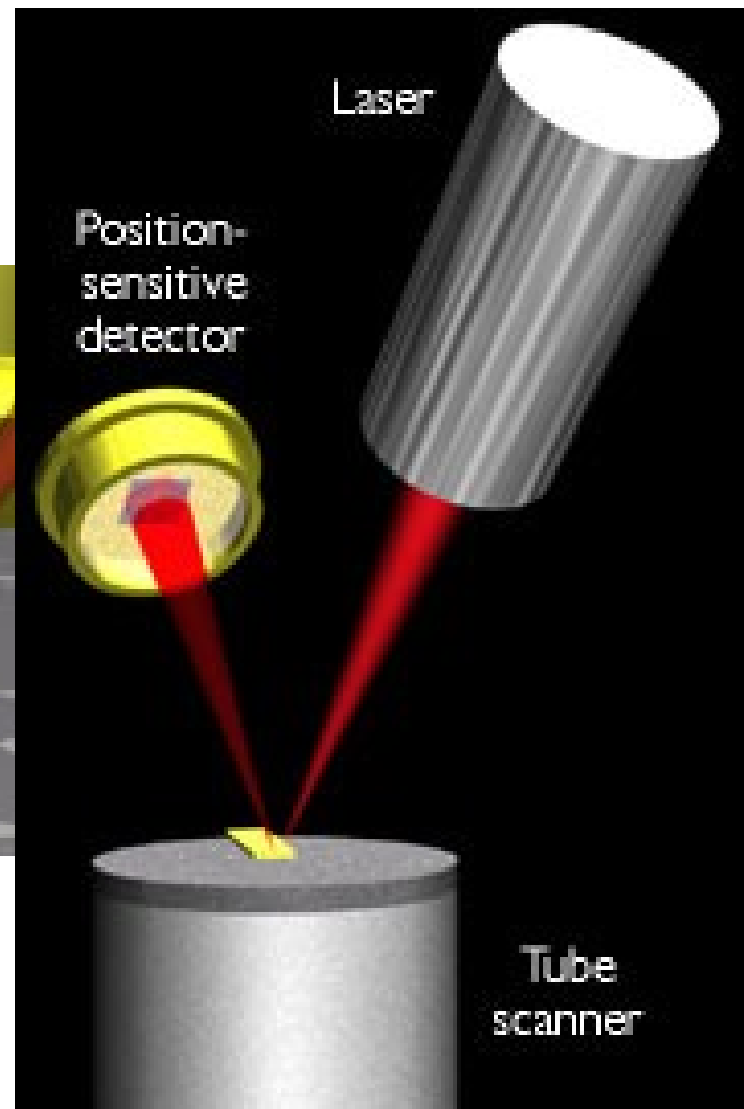
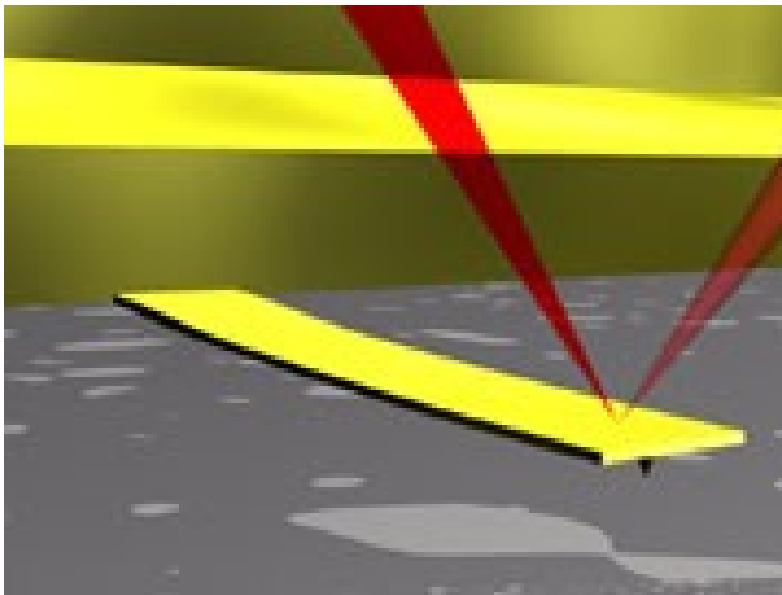
- Risoluzione laterale alta
- bassa sensibilità a strati adsorbiti
- bassa sensibilità a problemi di frizione
- buono per materiali facilmente danneggiabili
- funziona in liquido



Come funziona:

- Il cantilever oscilla alla frequenza di risonanza (50-500 KHz)
- L'ampiezza di oscillazione rimane costante
- La posizione in Z viene regolarmente aggiustata.





La posizione del cantilever viene rilevata con un laser il cui fascio è riflesso dal cantilever stesso e misurato da un rivelatore

Position Sensitive Detector

4-Quadrant Photodiode
(current in each quadrant changes
with light intensity)

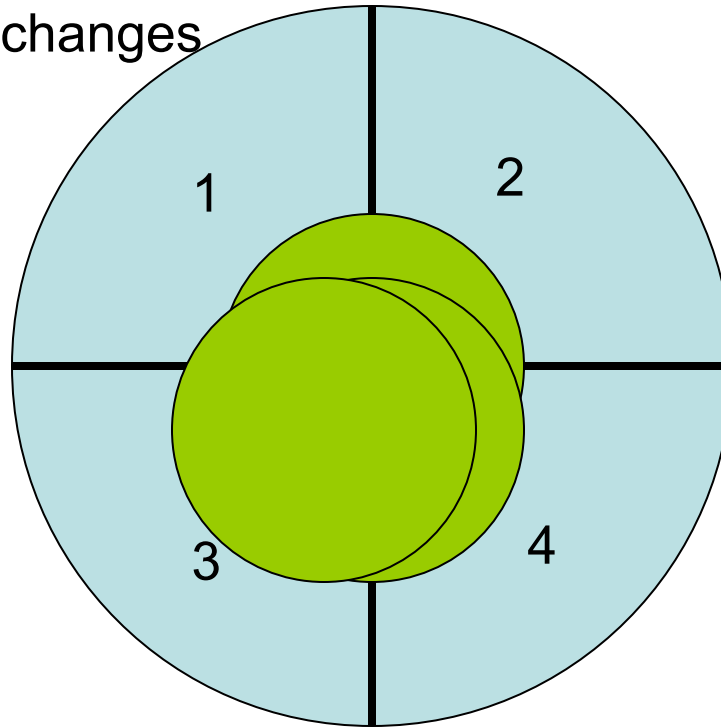
$$1+2-(3+4) = 0$$

$$1+2-(3+4) < 0$$

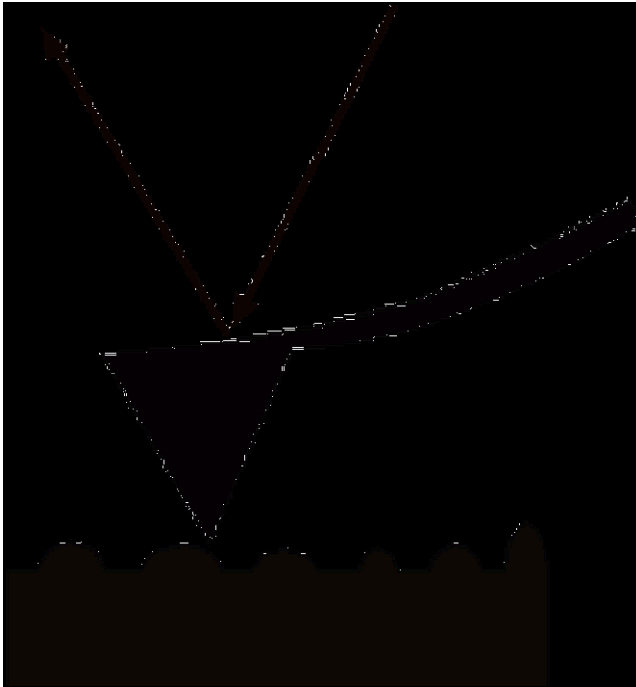
$$1+2-(3+4) < 0$$

and

$$1+3-(2+4) > 0$$



Contact Mode AFM



Forza Repulsiva tra gli atomi di superficie e gli atomi della punta , porta a deflessioni del cantilever , alterando il percorso del fascio riflesso.

Può danneggiare gli atomi della punta.

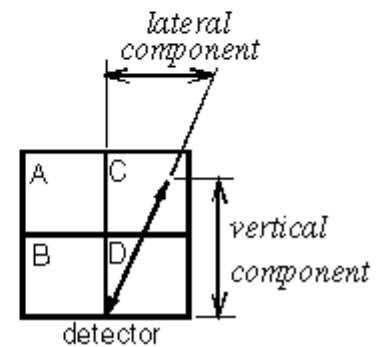
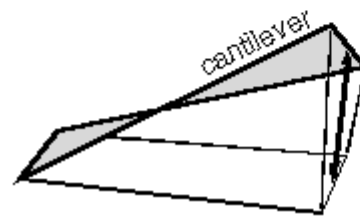
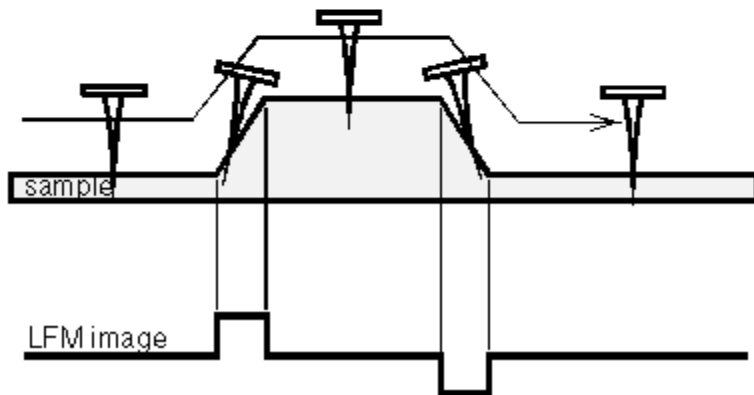
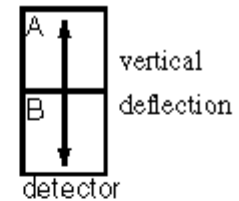
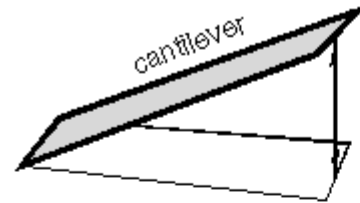
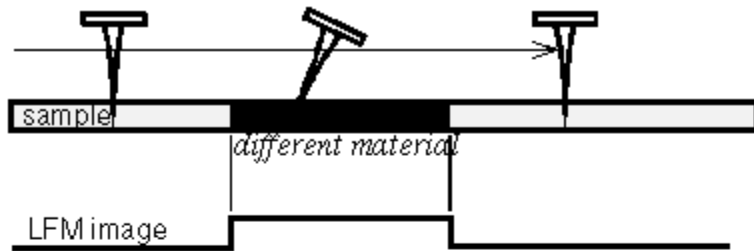
Modo di forza laterale AFM

Misura della forza frizionale. Durante la scansione, le forze frizionali sulla superficie tenderanno a piegare il cantilever.

Segnale= $1+3 - (2+4)$ as feedback/imaging signal.

Chimicamente sensibile : $-\text{CH}_3$ covered surface vs. $-\text{COOH}$ covered surface

Modo di forza laterale AFM



Non-Contact Mode AFM

Important when dealing with delicate samples.

Can achieve atomic resolution.

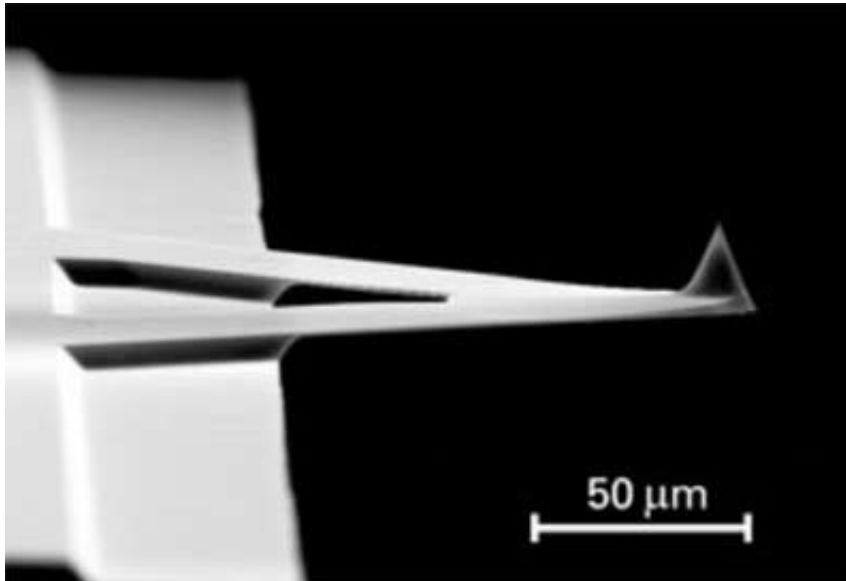
Vibrate tip at resonant frequency (100's of kHz).

As tip approaches surface, the attractive forces between the substrate and the tip alter the resonance condition.

For feedback/imaging

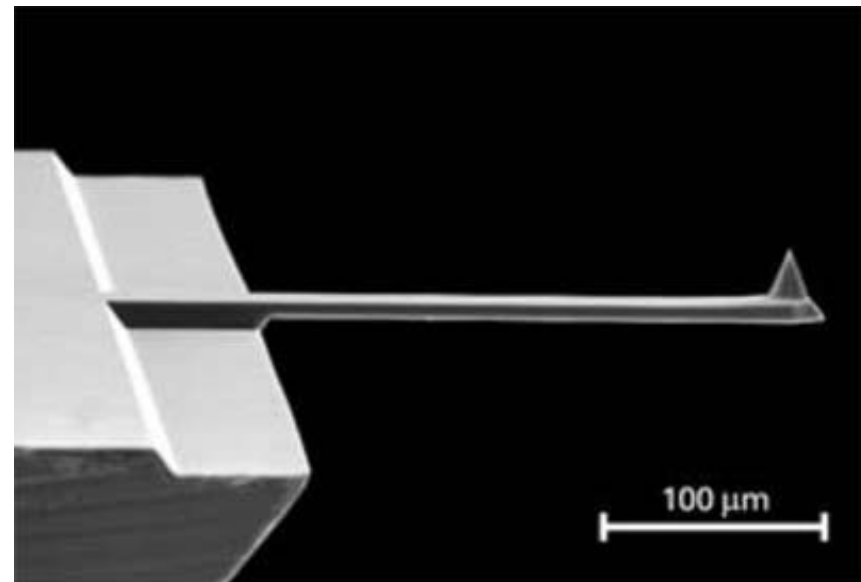
- frequency shift
- phase shift
- damping

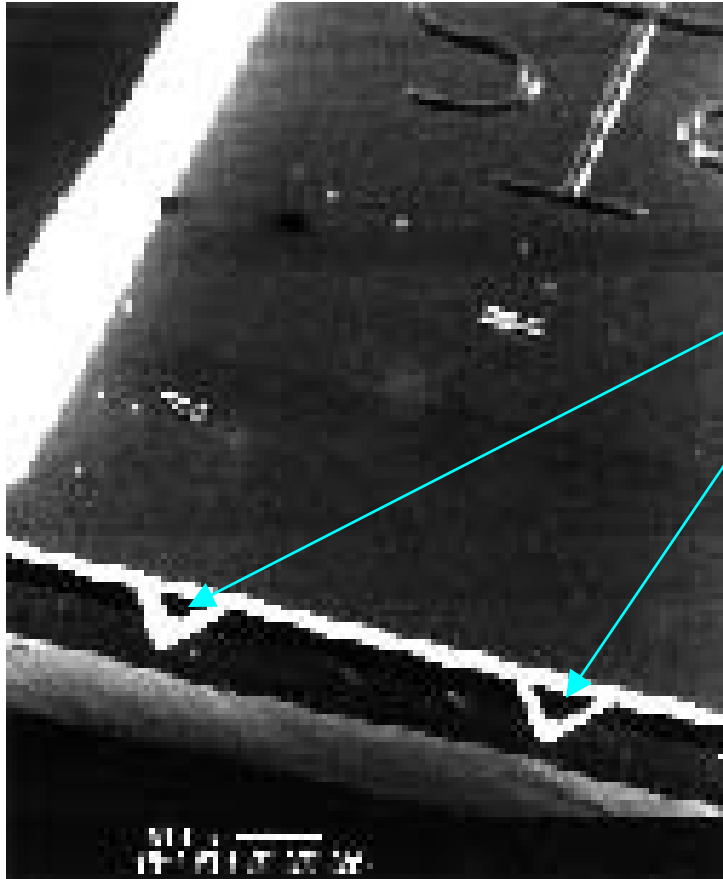
Cantilevers



For contact mode

For LFM and non-contact
mode

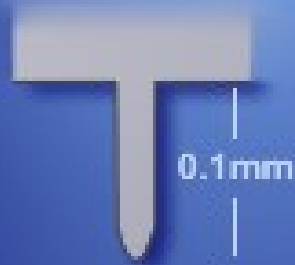




Cantilever da 100 μm

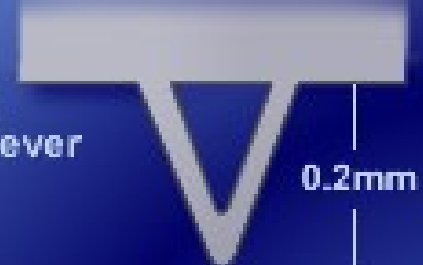
Commonly used cantilevers and their tips

straight
cantilever

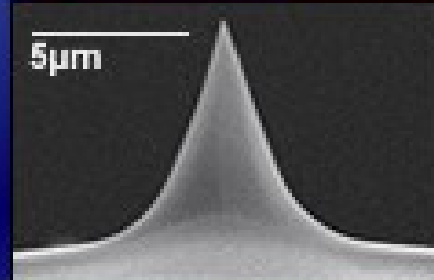


0.1mm

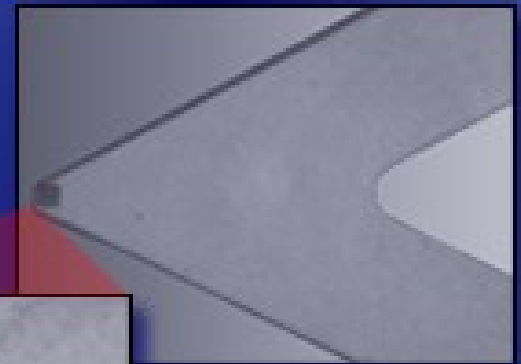
triangle-
shaped cantilever



0.2mm



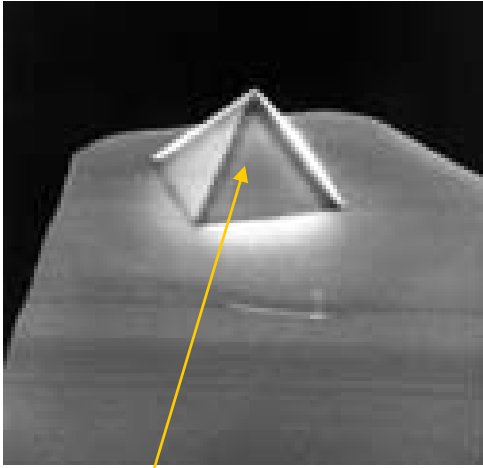
cone-shaped tip



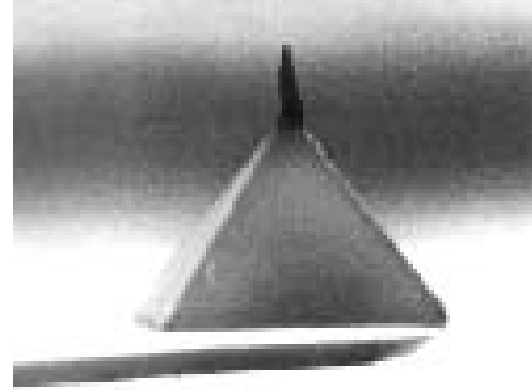
pyramidal tip

Varietà delle punte

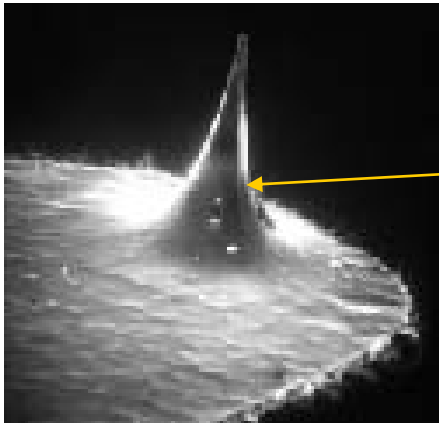
Le punte sono generalmente fatte con Si_3N_4 or Si



3 μm altezza
30 nm di raggio in punta



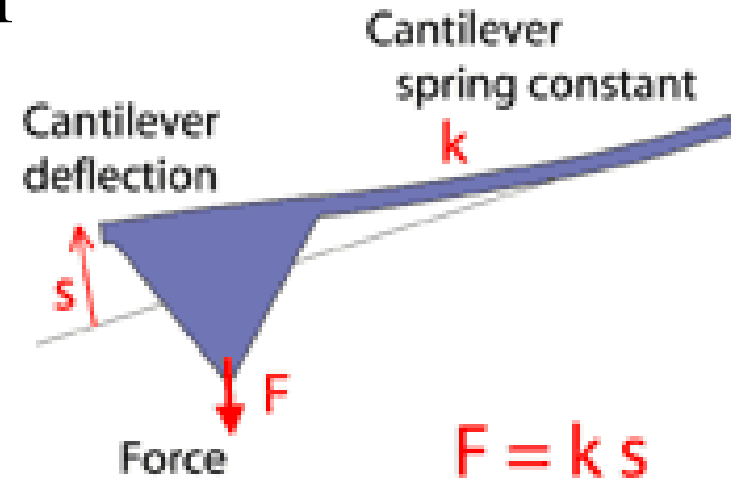
3 μm altezza
10 nm di raggio in punta



3 μm altezza
10 nm di raggio in punta

$$\text{frequenza di risonanza} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{M}}$$

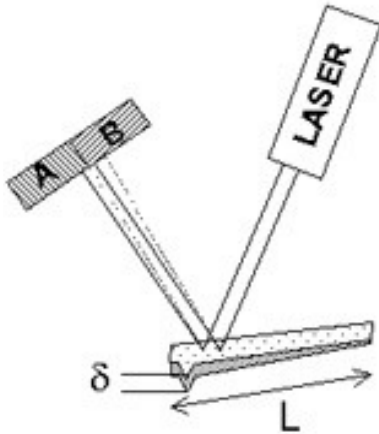
$$F = -k * s.$$



La costante elastica dei diversi cantilever possono variare di quattro ordini di grandezza tra 0.005N/m e 40 N/m.

Più il cantilever è spesso e corto e più tende ad essere rigido e con più alte frequenze di risonanza.

Risoluzione dell'AFM



Il più piccolo angolo di deflessione che è possibile rilevare è limitato dallo shot noise nei segmenti A e B del fotodiodo.

Il rumore può essere reso bassissimo con una potenza laser adeguata.

Un laser ottico da 1 mW emette circa 10^{15} fotoni/secondo e il corrispondente shot noise è di $\approx \sqrt{10^{15}}$ o circa 107 fotoni/secondo, così che il rapporto segnale/rumore è di uno su 107.

Risoluzione: Limiti sulle forze di interazione: rumore termico

Risoluzioni sotto l' Angstrom vengono realizzate solo a basse temperature.

La punta è sottoposta a movimento termico: quindi il campione deve fare più lavoro sulla punta di quello che fa il calore.

Prendendo una punta di costante k , la risoluzione più piccola Δz è data da :

$$\left\langle \frac{1}{2} k (\Delta z)^2 \right\rangle \approx \frac{1}{2} k_B T$$

Con k_{BT} dell'ordine di $4 \times 10^{-21} \text{ J}$ a temperatura ambiente, e con un cantilever con $k=1 \text{ N/m}$ la migliore risoluzione verticale ottenibile è dell'ordine di 0.5 nm

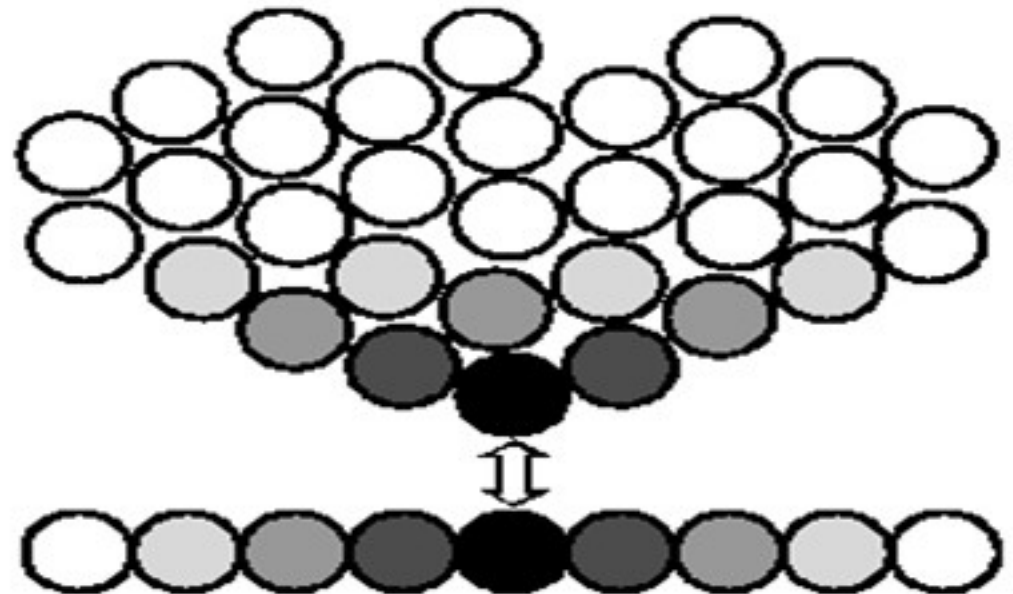
Risoluzione dell'AFM

La risoluzione dell'AFM è principalmente una funzione del raggio di curvatura della fine della punta

| **AFM-diversi atomi sulla punta interagiscono con diversi atomi della superficie**

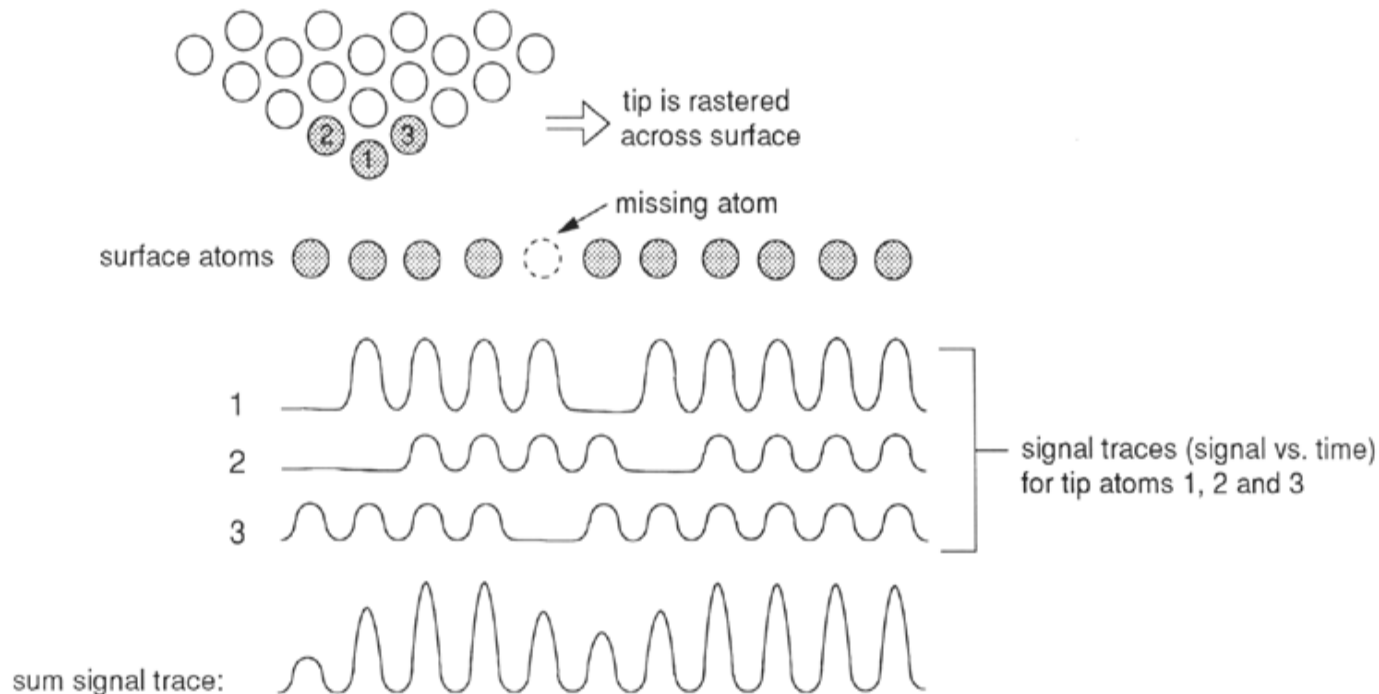
| **In contatto, non necessariamente un contatto con singolo atomo, raggio di contatto $\sim (Rd)^{1/2}$**

**(d-profondità di penetrazione, R-
raggio della punta)**



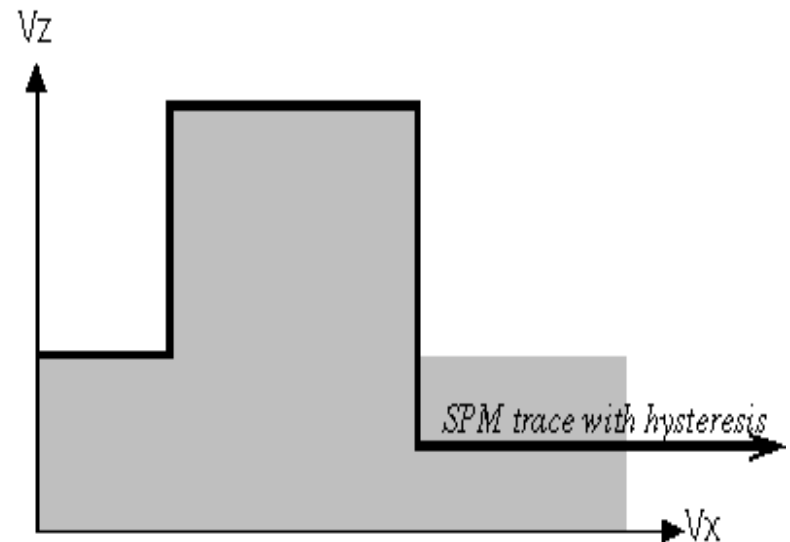
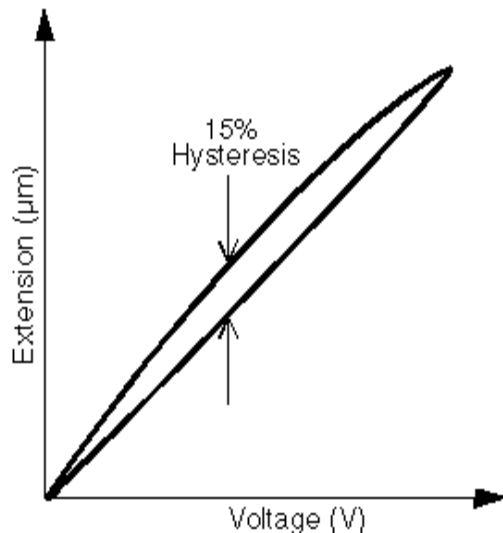
AFM -Resolution

- Interazione di un atomo 1 : $t=0$ diversa dall'interazione dell'atomo 3,2
- Ciascun atomo della punta produce un segnale con un offset rispetto all'altro
- La periodicità è riprodotta ma non c'è risoluzione atomica



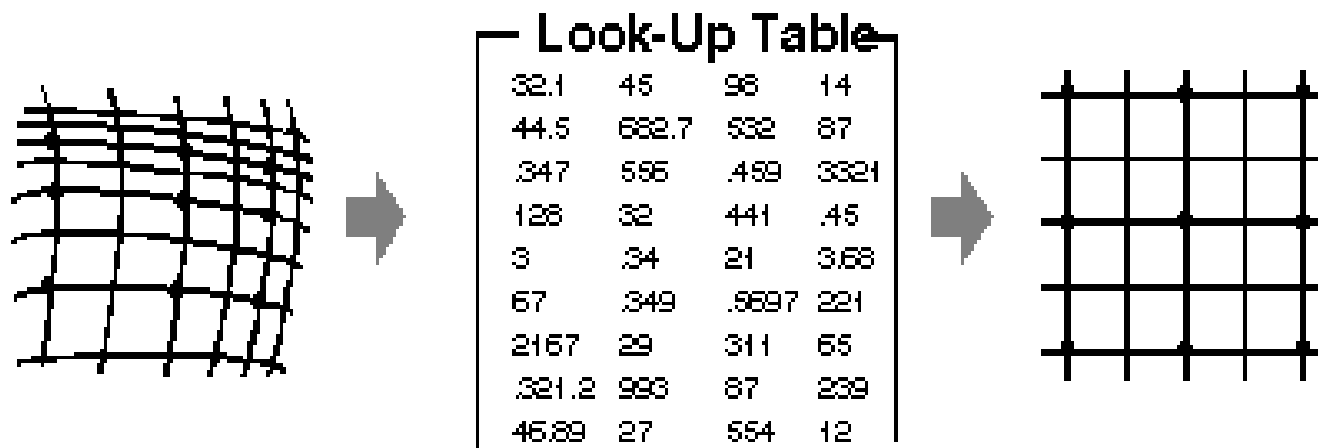
Isteresi dello scanner AFM

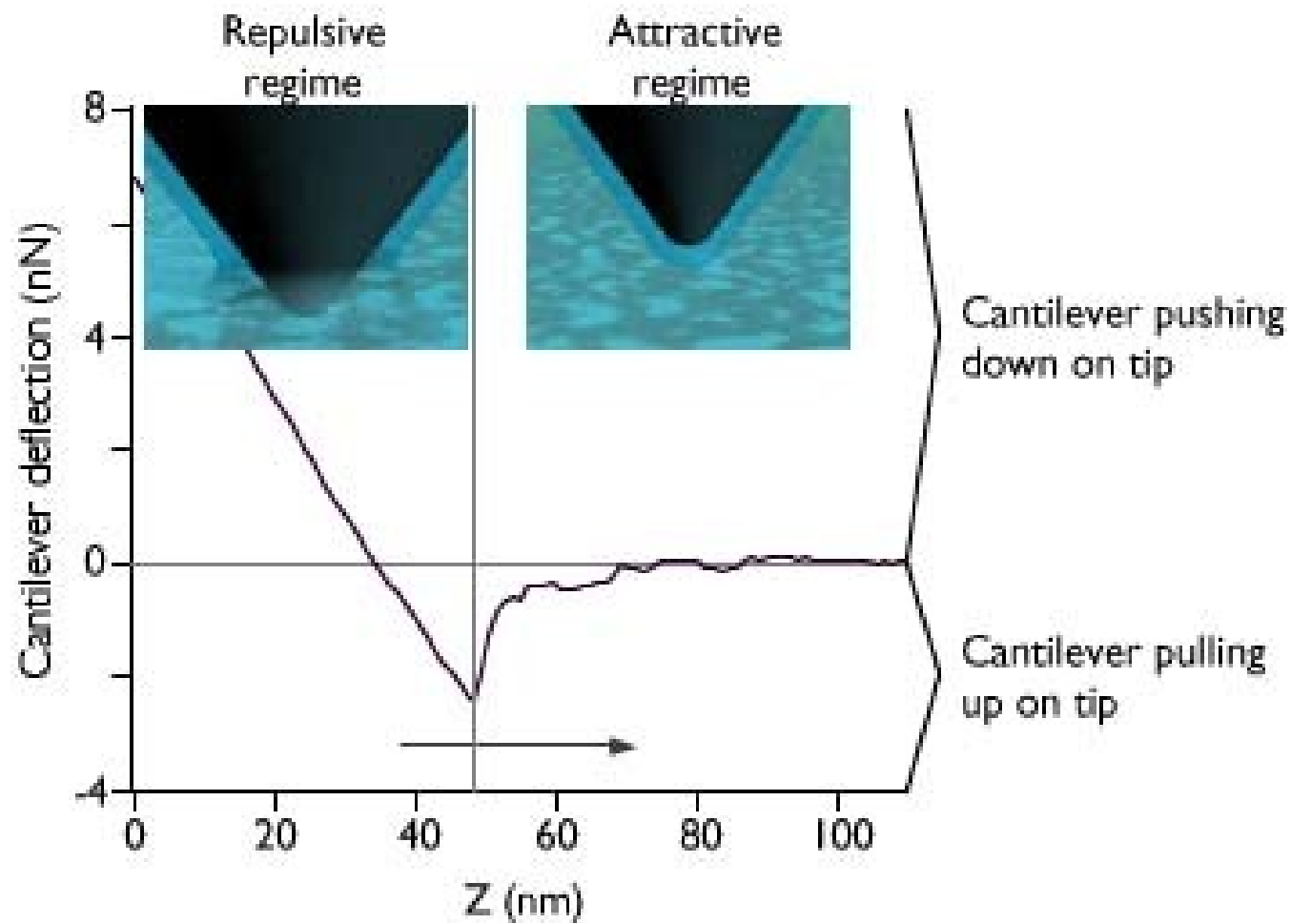
- Isteresi può raggiungere il 20 %, in x-y può essere osservata guardando due direzioni opposte di scan
- Sulla z, se l'estensione ha bisogno di più voltaggio $\Rightarrow$ step errato.

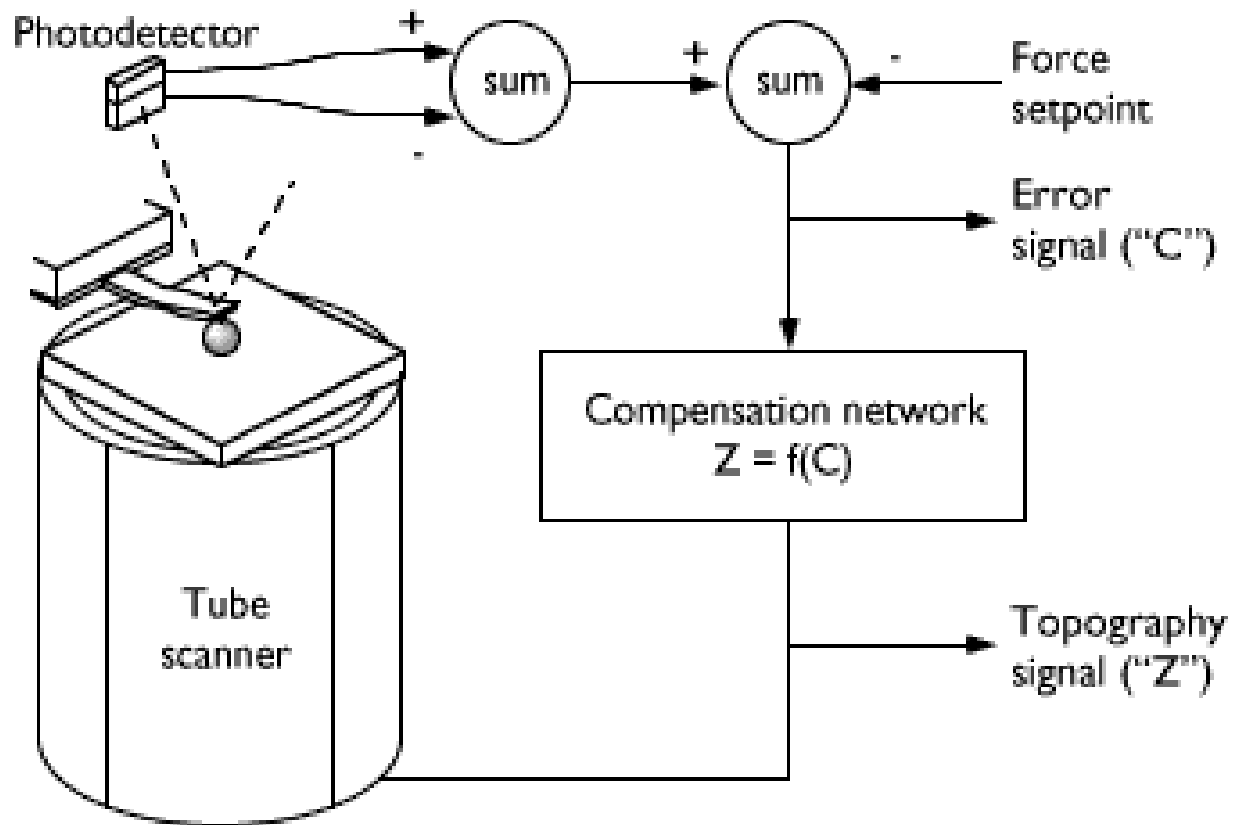


Correzioni dello scanner

- Attraverso un reticolo di calibrazione si possono correggere i voltaggi; le correzioni sono accurate solo se la scansione è simile a quella di calibrazione. (~10% deviazione)

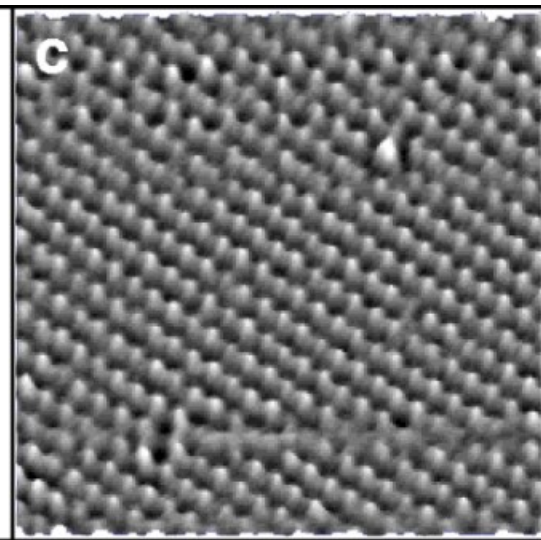
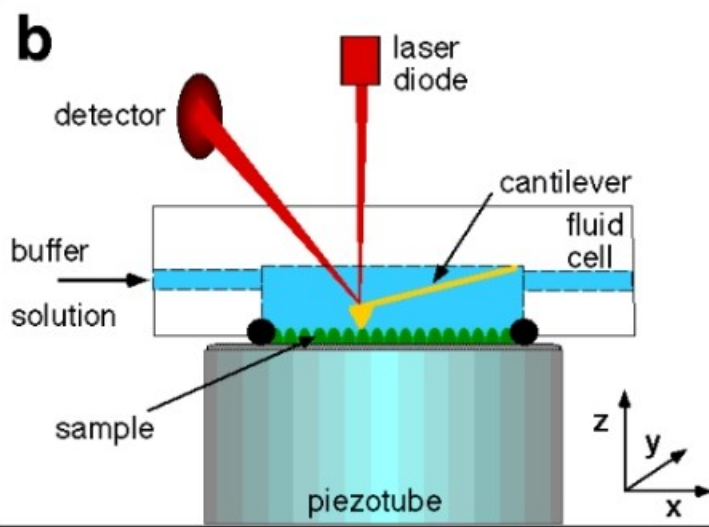
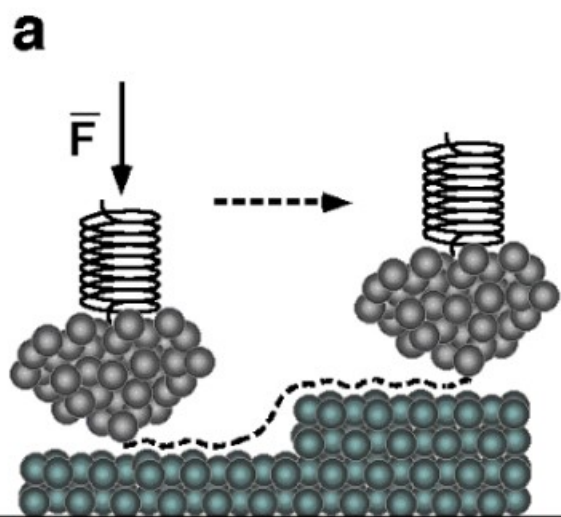






Vantaggi della Microscopia a Forza Atomica

- Gli ambienti di lavoro possono essere indifferentemente:
 - **vuoto** (per campioni che necessitano del minore numero di impurità)
 - **aria**
 - **liquidi** (particolarmente interessante per osservazioni in-vivo)
- Non si necessita di particolare preparazione dei campioni:
 - il campione deve essere depositato su una superficie piana (spesso si usano sfoglie di mica)
- La risoluzione è paragonabile a quella di un microscopio elettronico
- Possibilità di elaborare le immagini al computer (immagini 3D)



Risoluzione del microscopio a forza atomica

La risoluzione non è più dipendente dalla lunghezza d'onda

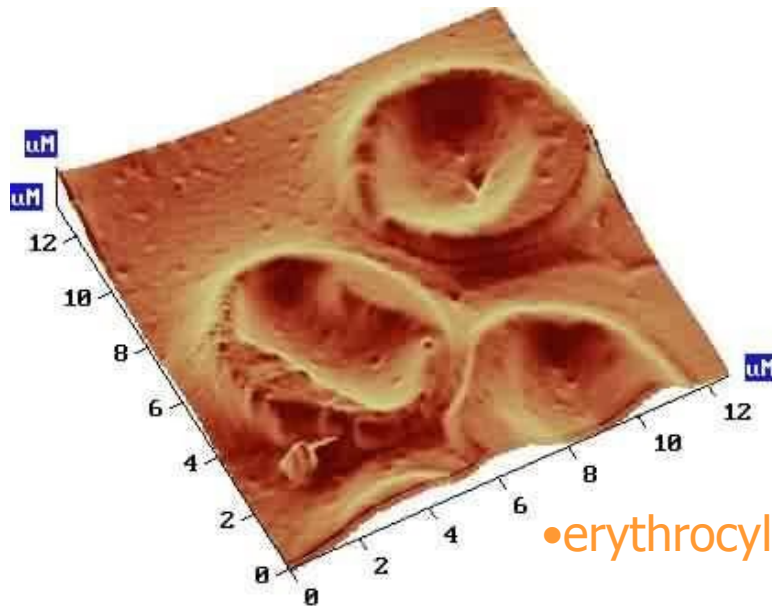
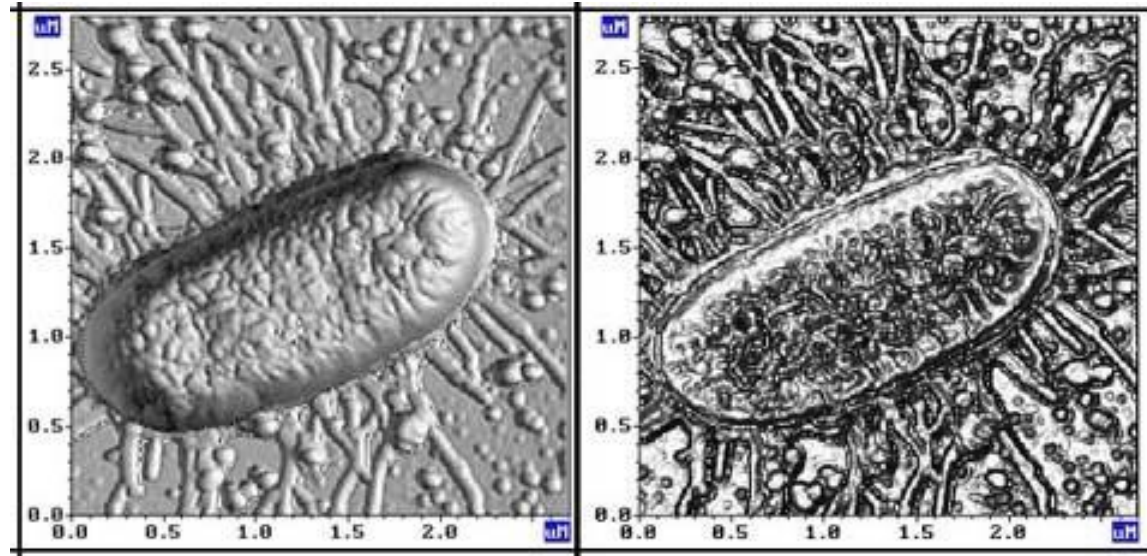
La grandezza della punta dà più o meno risoluzione al microscopio.

Al momento risoluzioni dell'ordine atomico sono possibili solo per superfici piane

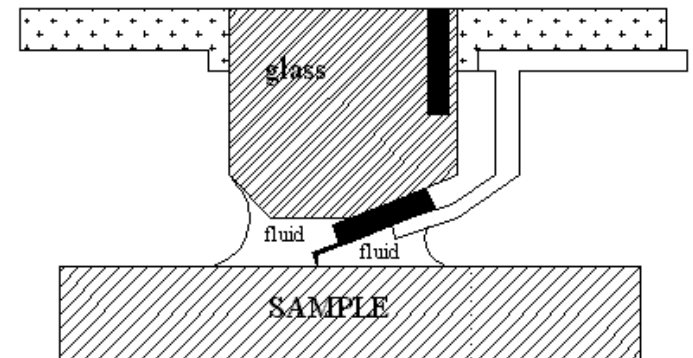
Migliori risoluzioni saranno possibili con lo sviluppo di punte innovative

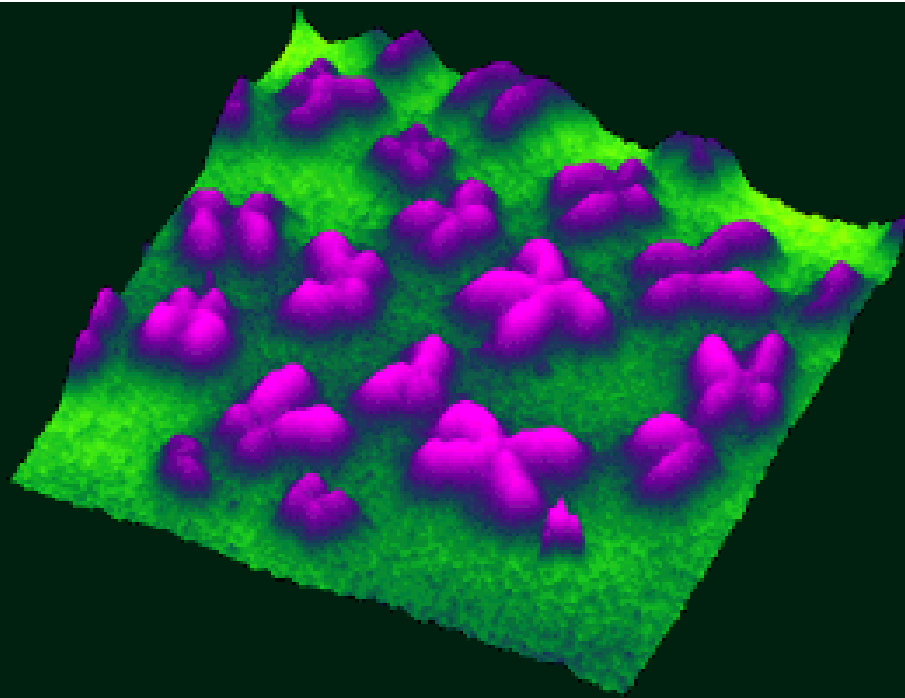
Tapping Mode AFM in Biology

•E-coli

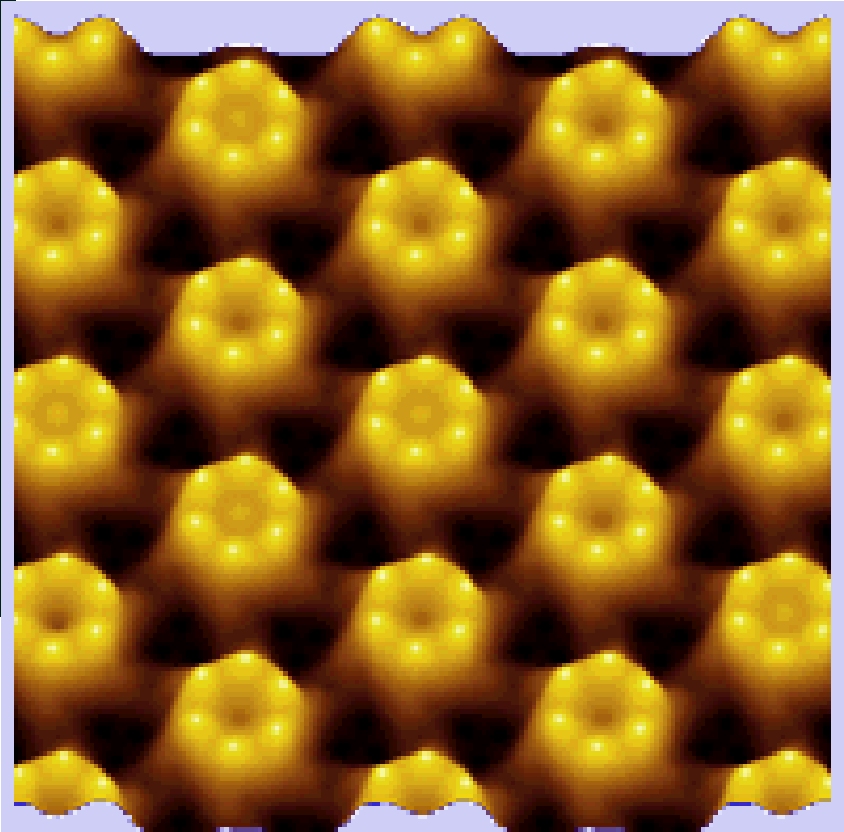


•erythrocytes





Human Chromosomes. Thanks to Digital Instruments for the picture.



Protein surface layer of D. Radiodurans. Courtesy of Digital Instruments.

Preparazione dei campioni

Non c'è praticamente necessità di preparazione dei campioni.

Molto spesso tutto si riduce a mettere la soluzione con la sostanza da studiare su uno strato di mica (che adsorbe il liquido) o su vetro.

Fenomeni e reazioni delle forze tra il substrato adsorbitore e la soluzione.

Il substrato (che può essere di vario tipo oltre a mica e vetro) deve essere opportunamente trattato precedentemente in modo da non contaminare il campione.

Fissaggio: in alcuni casi (in cui il materiale biologico è troppo morbido) si può fissare il materiale come nel caso del microscopio elettronico. In alcuni casi si può anche raffreddare il campione.

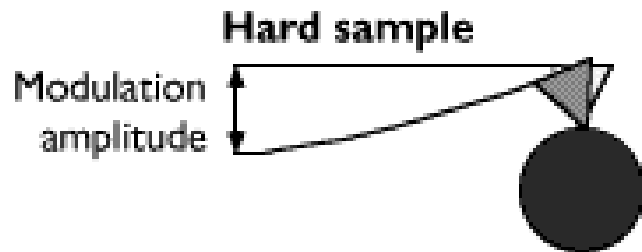
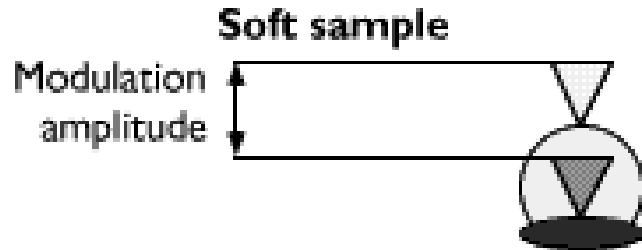
N. Matsko, M. Müller, Journal of Structural Biology 146 (2004) 334-343

Altre applicazioni dell'AFM

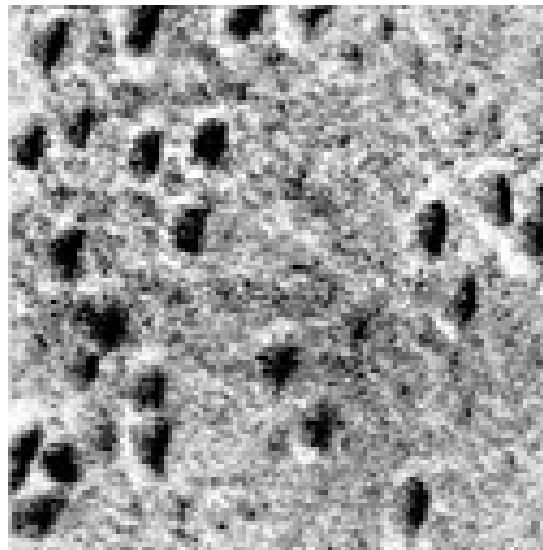
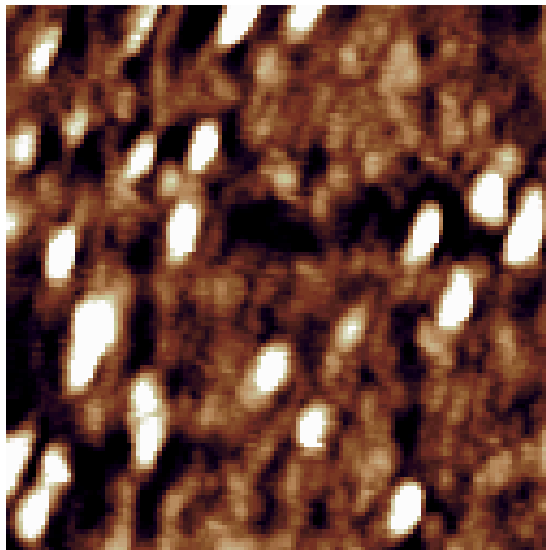
Una peculiarità della microscopia a forza atomica è la possibilità di usare lo strumento per altre applicazioni che possono essere di misura ma anche di modifica del campione

Nel campo dei semiconduttori l'AFM si usa anche per litografia.

AFM: elasticità del campione

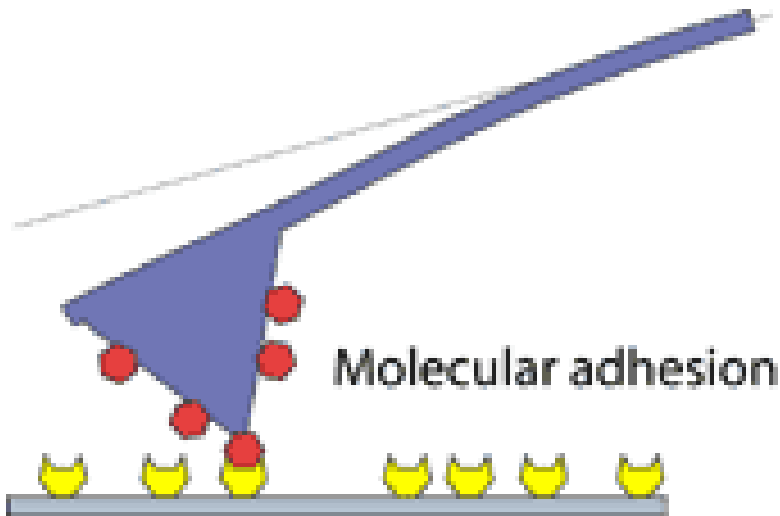


Si può campionare sotto forma di immagine **l'elasticità del campione** spingendo la punta sul campione e misurando la **deflessione risultante** del cantilever.



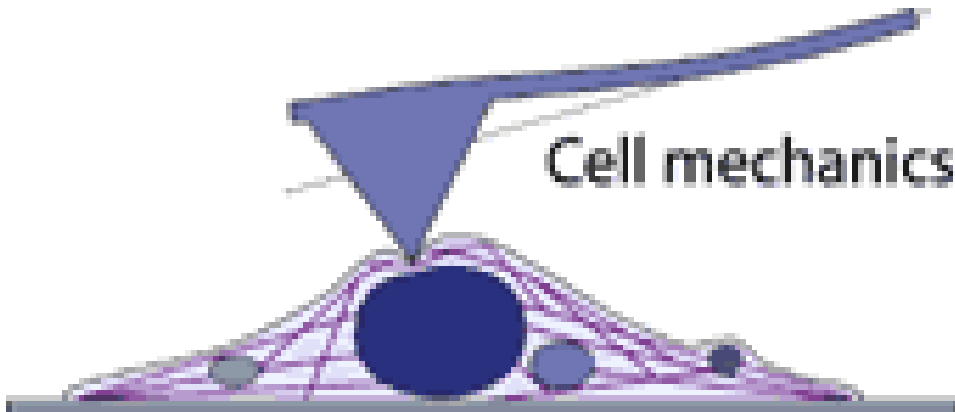
1 x 1 μm immagini di **topografia (sinistra)** ed **elasticità (destra)** di albumina di siero bovino su silicio

Adesione Molecolare



- Si può misurare l'adesione tra le molecole attaccate alla punta ed al campione.
- Possono essere anticorpi e antigeni o altre coppie recettore-legante.
- Le forze adesive possono essere misurate e mappate lungo la superficie e si possono ricavare informazioni sull'energia e sulla cinetica del legame.

Meccanica cellulare e sue interazioni



- Si può studiare la risposta viscoelastica delle celle usando un cantilever per stimolare le cellule.
- Sulle cellule in vivo si possono rilevare cambiamenti nelle proprietà meccaniche nella divisione cellulare o quando alcune sostanze vengono fatte reagire con la cellula.
- Cellule sensibili a stimoli meccanici come le cellule dell'orecchio possono essere studiate.
- Si possono mappare le forze di adesione sulla superficie per studiare la distribuzione dei recettori.

Modo Immagine

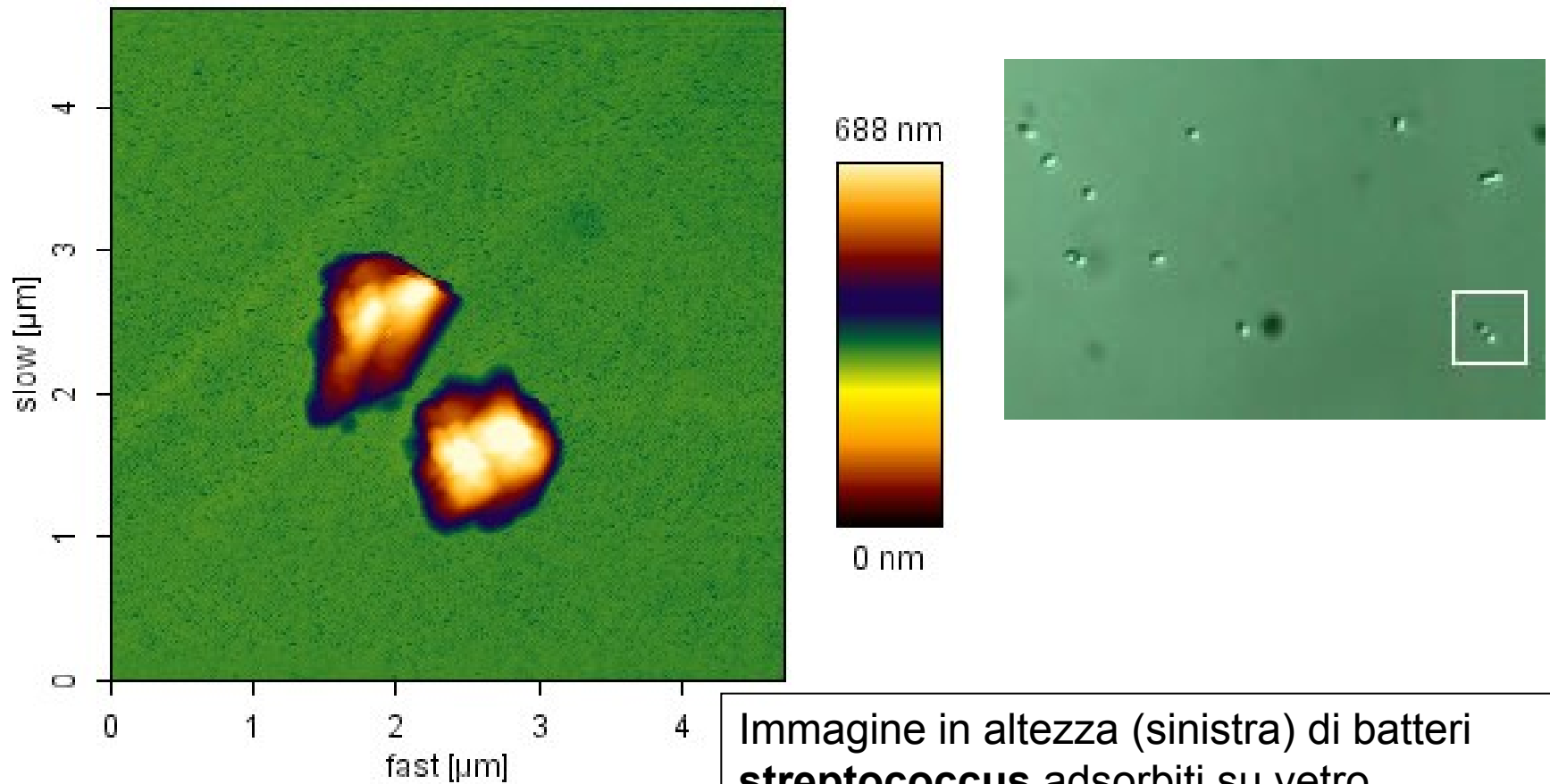


Immagine in altezza (sinistra) di batteri **streptococcus** adsorbiti su vetro.

intermittent contact mode

Modo Immagine

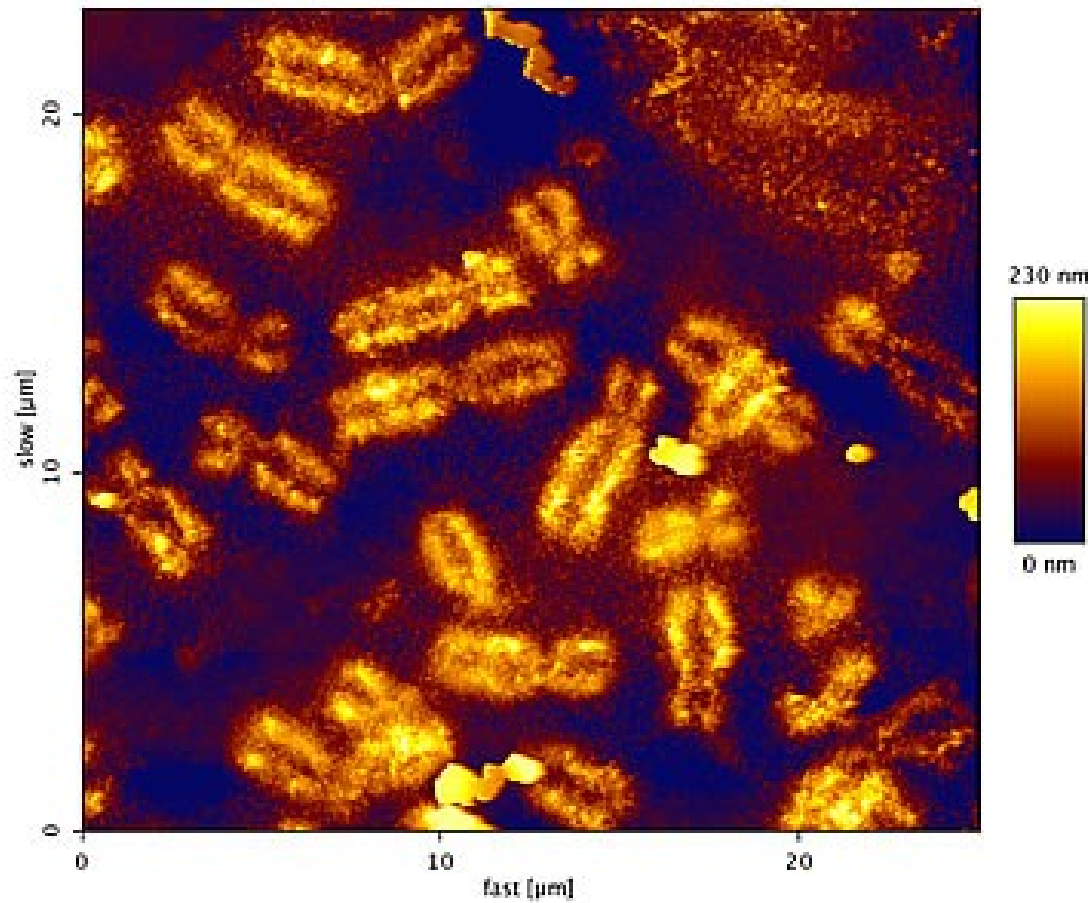
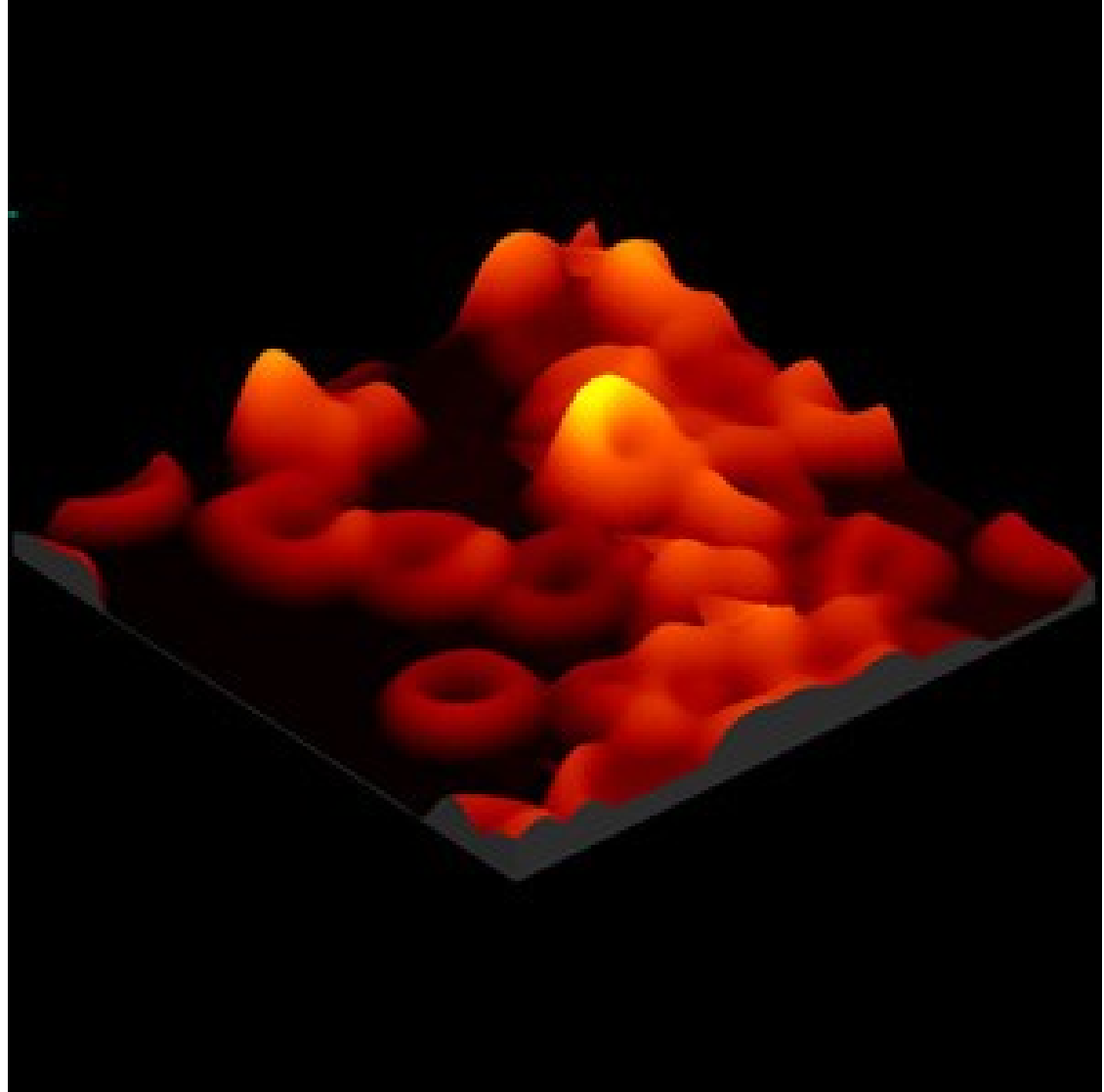


Immagine in altezza(sinistra) dei cromosomi umani di metafase del linfocita

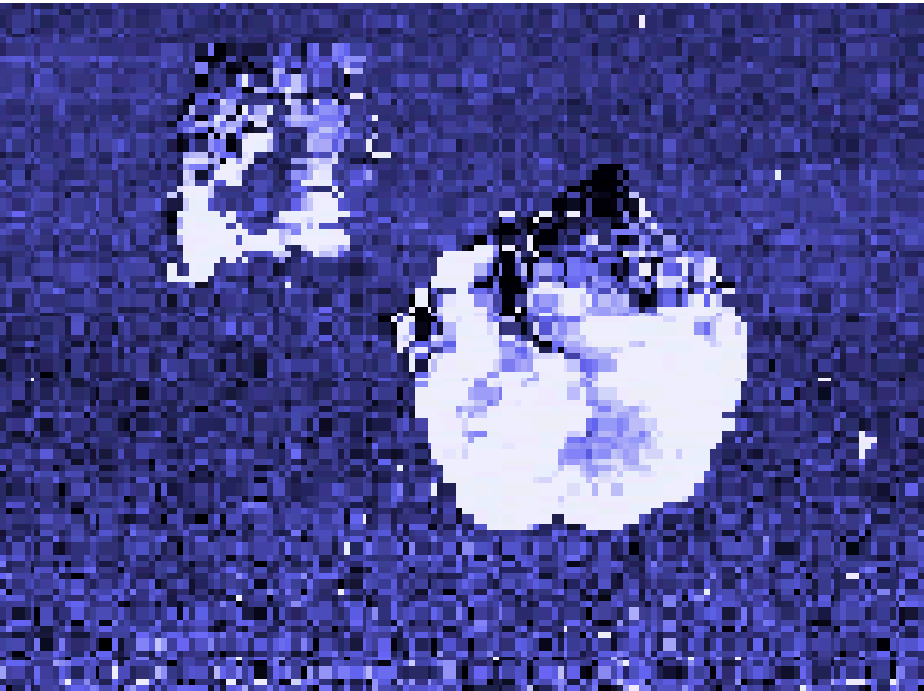
intermittent contact mode

Modo Immagine 3D



height image of eritrociti
contact modescan field $40\ \mu\text{m} * 40\ \mu\text{m}$
z-range $2.1\ \mu\text{m}$

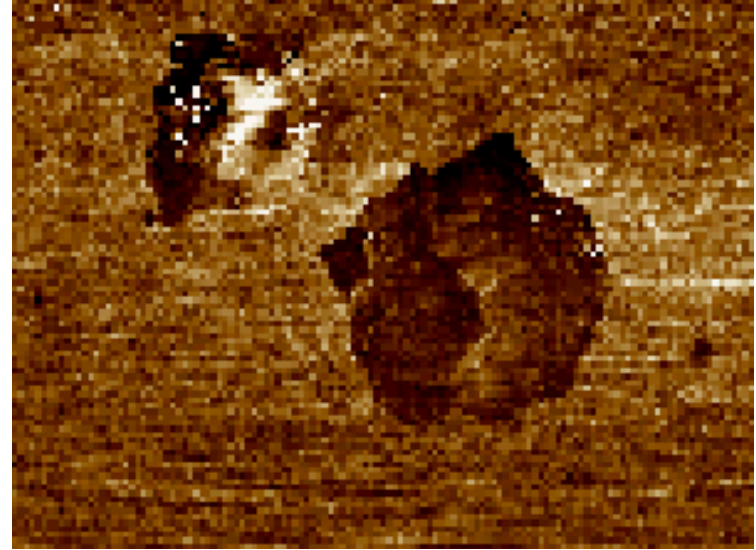
Modo Adesione e Rigidità



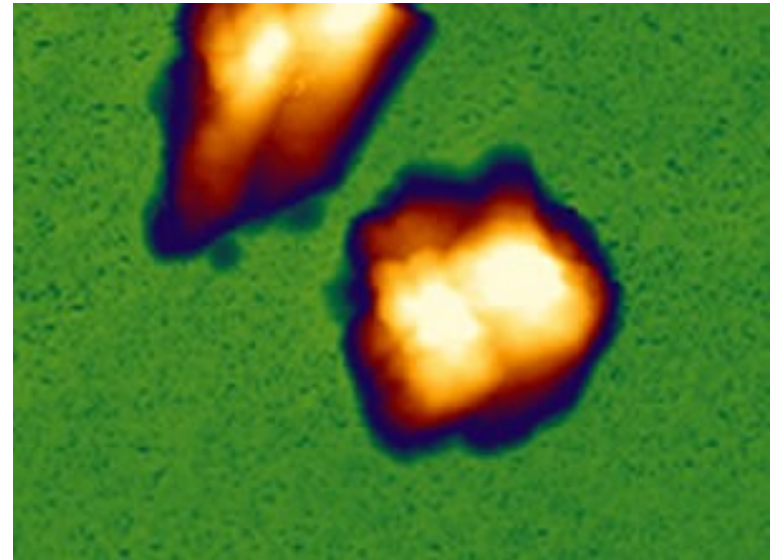
Mapa di rigidità di batteri
streptococcus adsorbiti su vetro,

non contact mode

scan field $2.8\ \mu\text{m} \times 2.1\ \mu\text{m}$
z-range 0 - 103 pN/nm

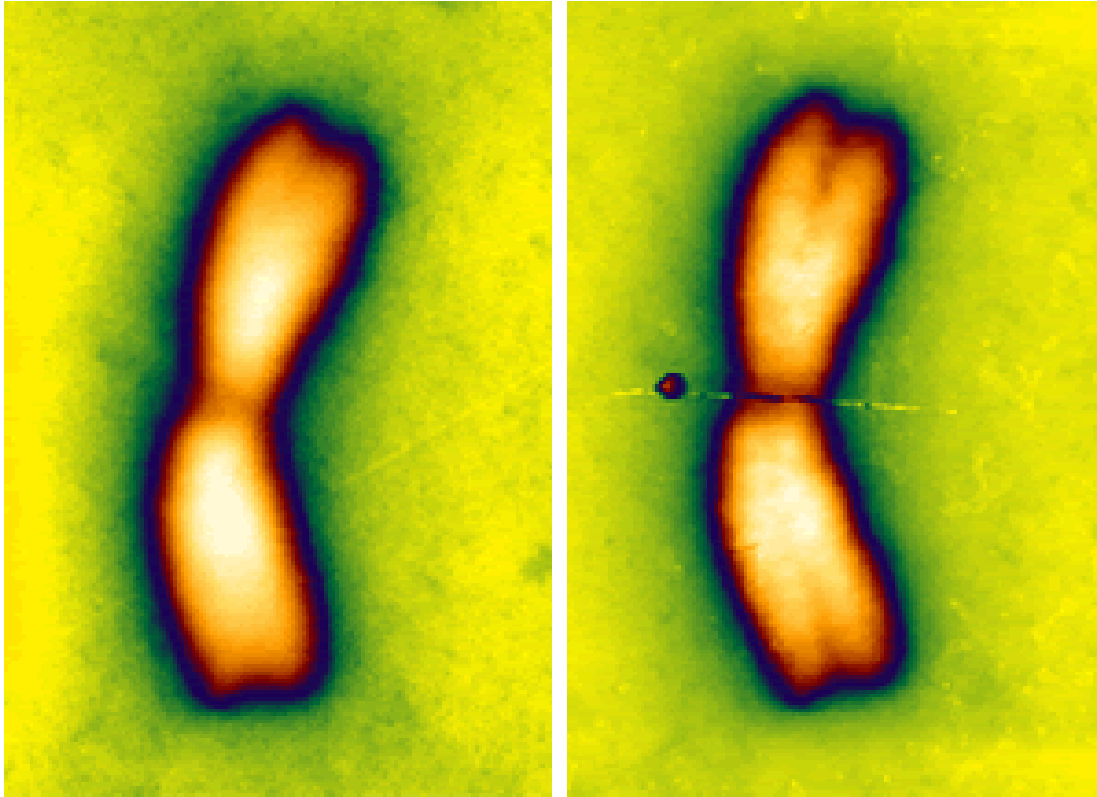


adhesion



height image

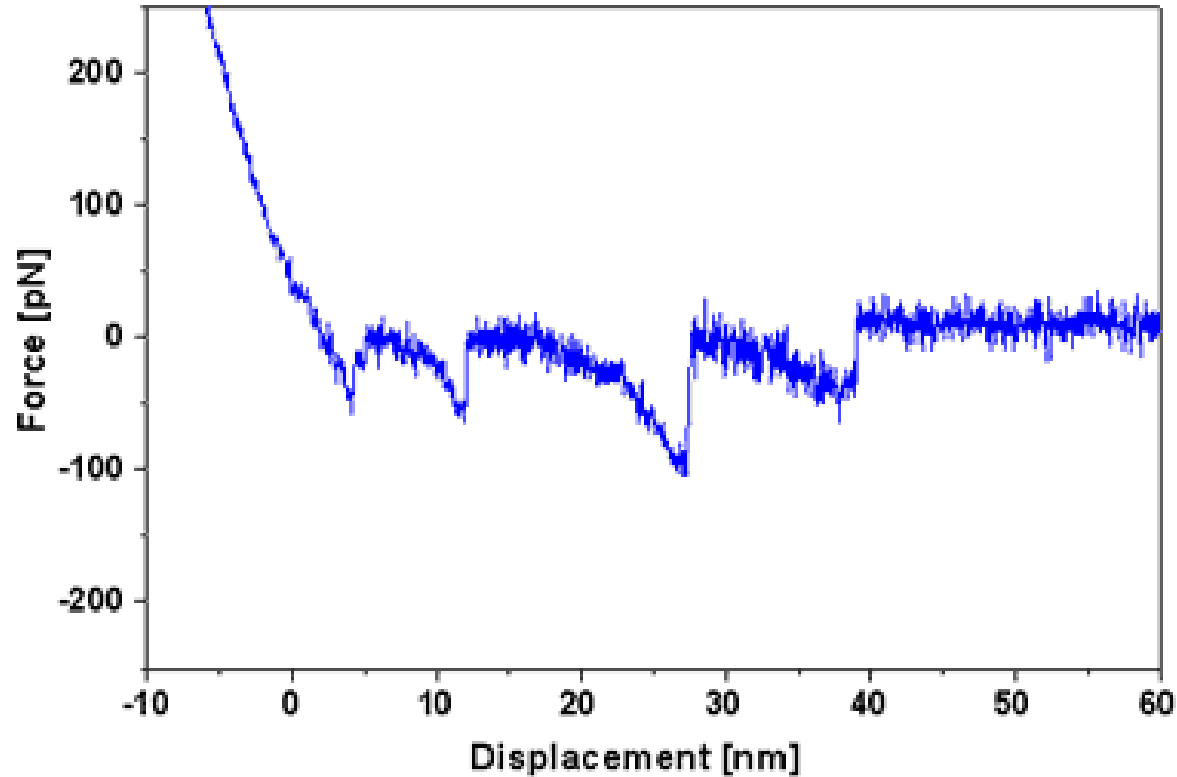
Manipolazione



* Sample courtesy of Dr. T. Ohtani, NFRI, Tokyo

height images of the
same chromosome
before and after
manipulation scan field
8 μm * 12 μm

Misura delle forze



Force distance retract curve of the unfolding of a single protein in a bacteriorhodopsin membrane

SNOM

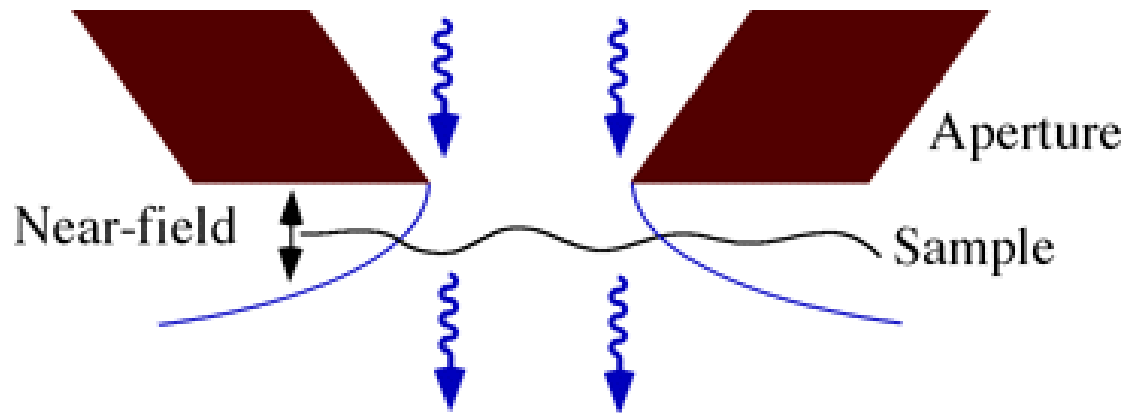
Scanning Near-Field Optical Microscopy

Tecnica NSOM

Mentre la spettroscopia ottica tradizionale ha una risoluzione limitata da $\lambda/2$ (~200 nm per la luce visibile),

La spettroscopia in near-field arriva a risoluzioni inferiori alla lunghezza d'onda (20 nm - 200 nm).

Nella spettroscopia near-field, la luce si propaga attraverso una apertura più piccola della lunghezza d'onda della luce (20 nm - 200 nm).

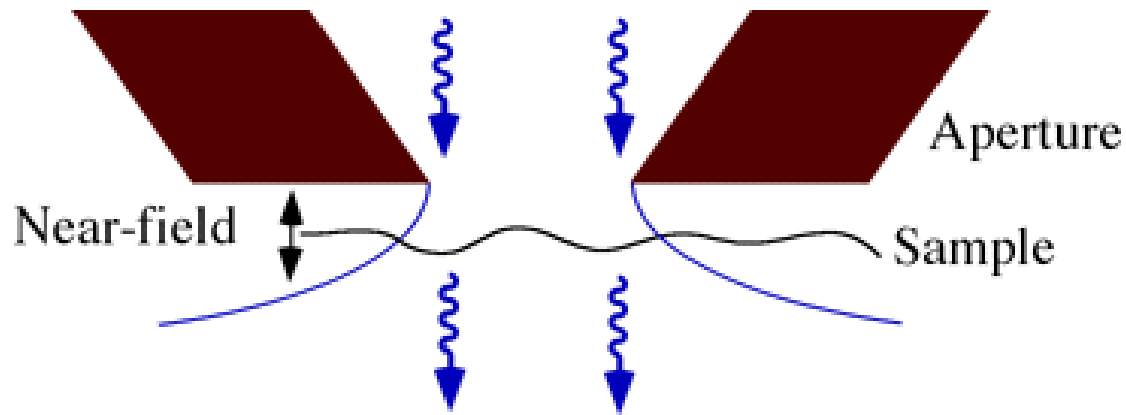


Il campione è illuminato a distanze di qualche nanometro dall'apertura.

All'interno del campo vicino la luce viene confinata ad un'area dell'ordine della grandezza dell'apertura.

La risoluzione di SNOM dipende dalla grandezza dell'apertura usata e dalla distanza dal campione ma non più dalla lunghezza d'onda della luce.

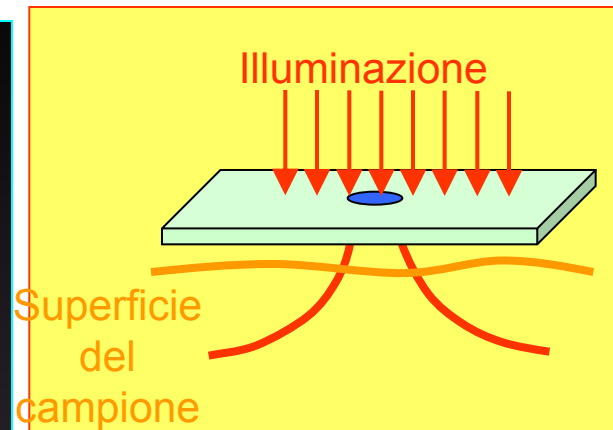
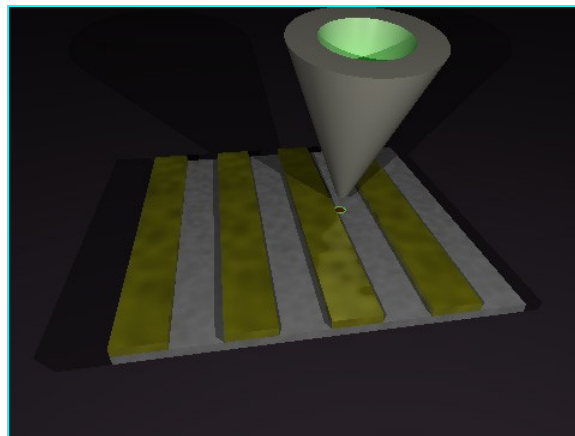
Un'immagine viene generata irraggiando una piccola porzione di un oggetto posto all'interno dell'apertura in near-field e scansionando il campione.

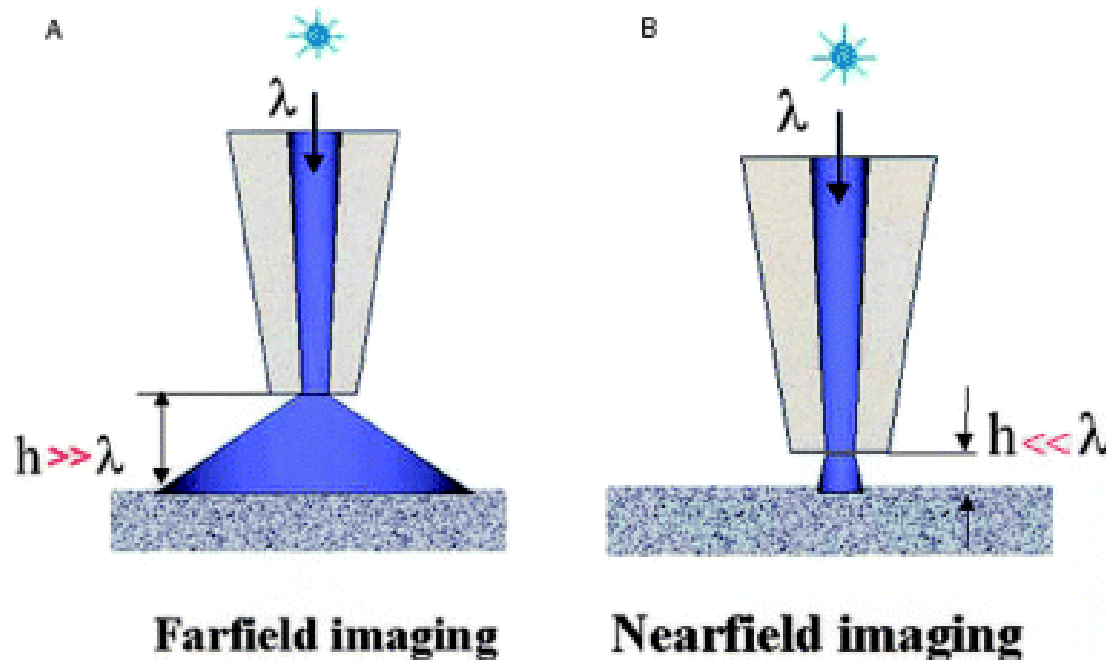


Rilevamento in campo prossimo

Apertura SNOM

- La luce viene raccolta vicino al campione da una fibra ottica con una apertura più piccola della lunghezza d'onda
- La luce riflessa è debole
- La risoluzione è limitata a $\lambda/10$





Paragone tra l'imaging di un campione in far-field a near-field

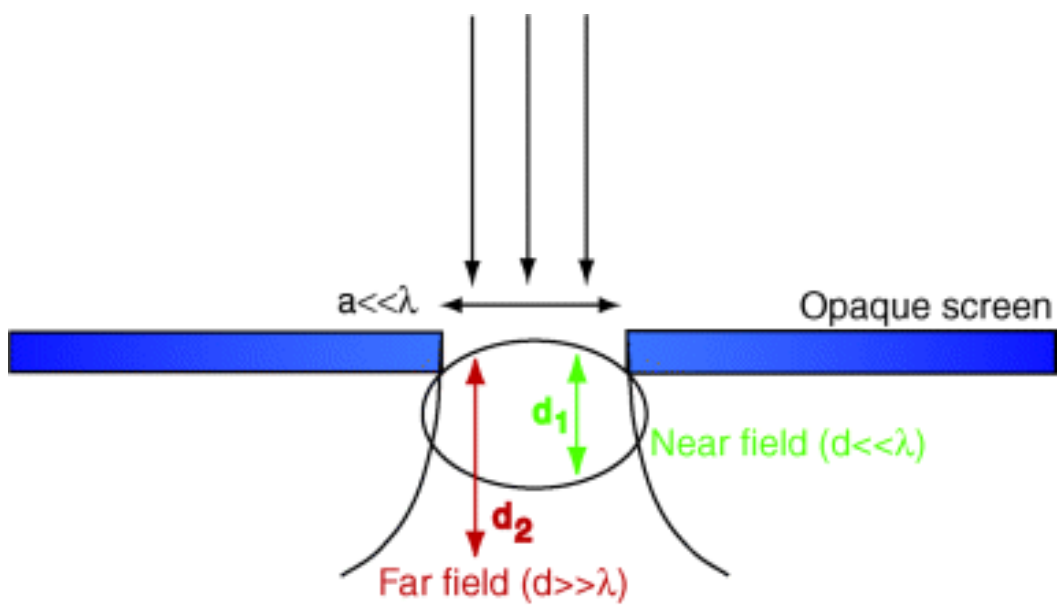
(A) Far-field imaging: la sorgente luminosa o l'elemento che raccoglie la luce è separato dal campione da una distanza, $h \gg \lambda$, la lunghezza d'onda della luce usata per illuminare il campione. La luce viene diffratta in modo che l'area illuminata sia molto maggiore dell'apertura.

- I dettagli più piccoli della lunghezza d'onda sono persi.

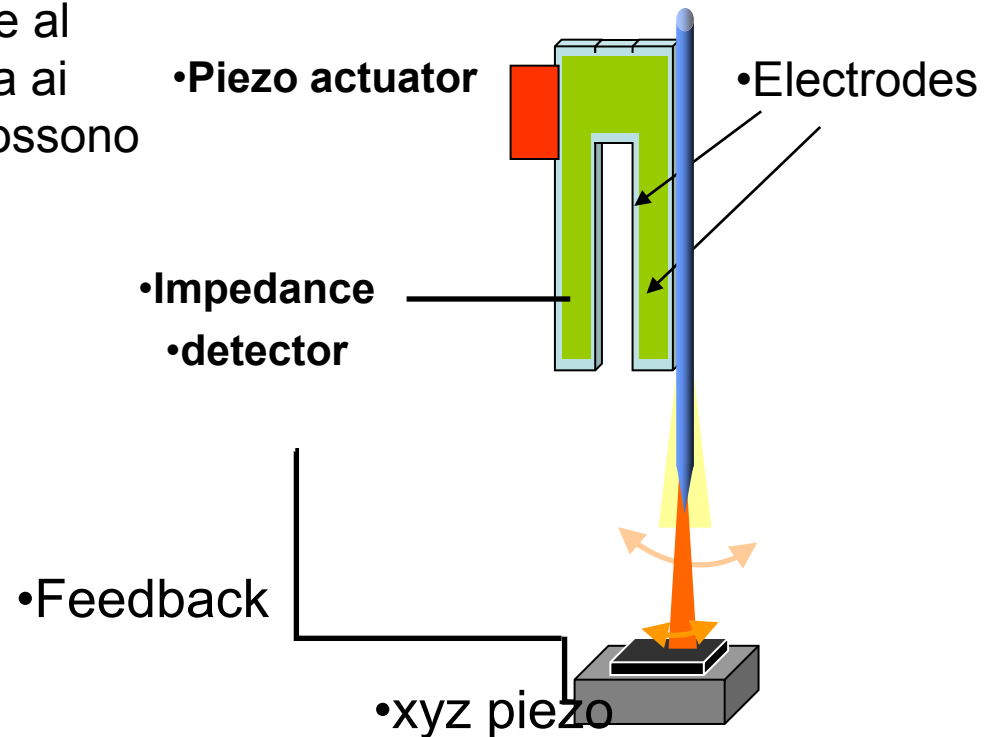
(A) Near-field imaging: l'ottica è separata dal campione da una distanza, $h \ll \lambda$. L'area illuminata corrisponde all'apertura dell'ottica.

Illuminazione near-field: Una apertura di diametro $< \lambda$ è fatta su un superficie piatta.

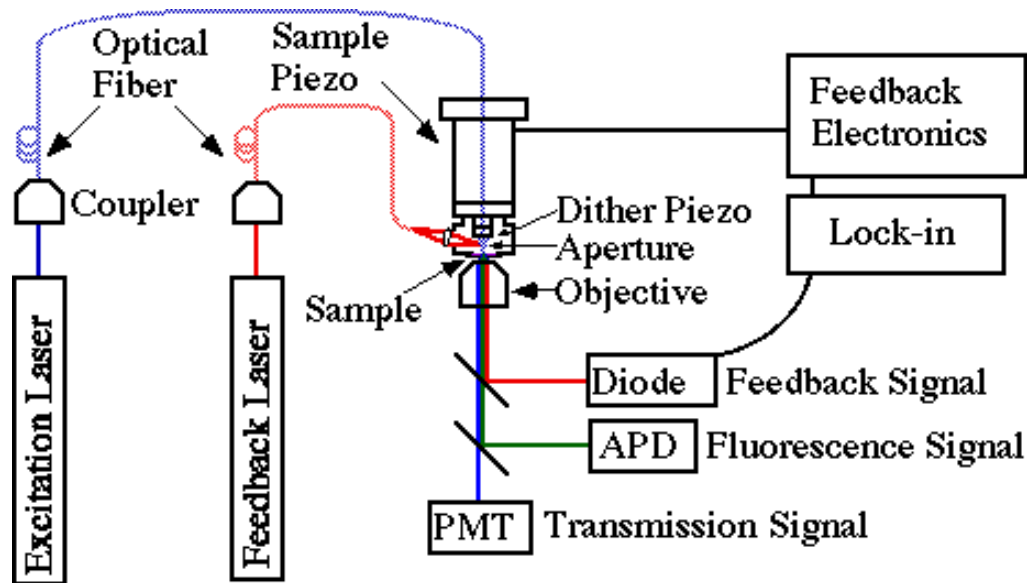
Il campo “evanescente” decade rapidamente all’allontanarsi dall’apertura (decadimento esponenziale), illuminando solo alla profondità d_1 : campo vicino.



- Il campo prossimo decade esponenzialmente con la distanza
- La punta deve essere tenuta a distanza controllata dalla superficie del campione
- Meccanismo di feed back : forza trasversale (simile al modo tapping di AFM)
- Rivelazione di feedback: oscillatore al quarzo (STM corrente non è adatta ai campioni biologici; metodi ottici possono disturbare la risposta ottica).

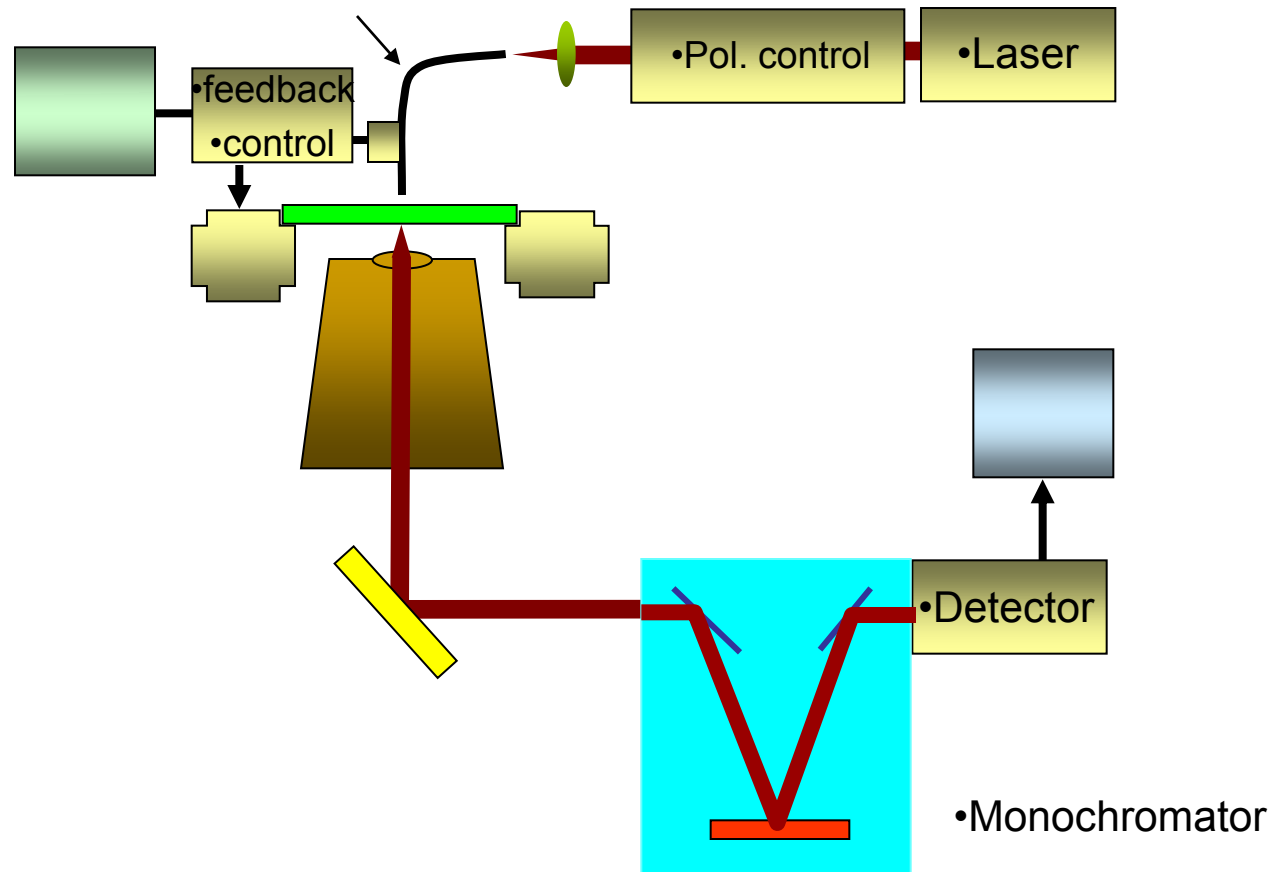


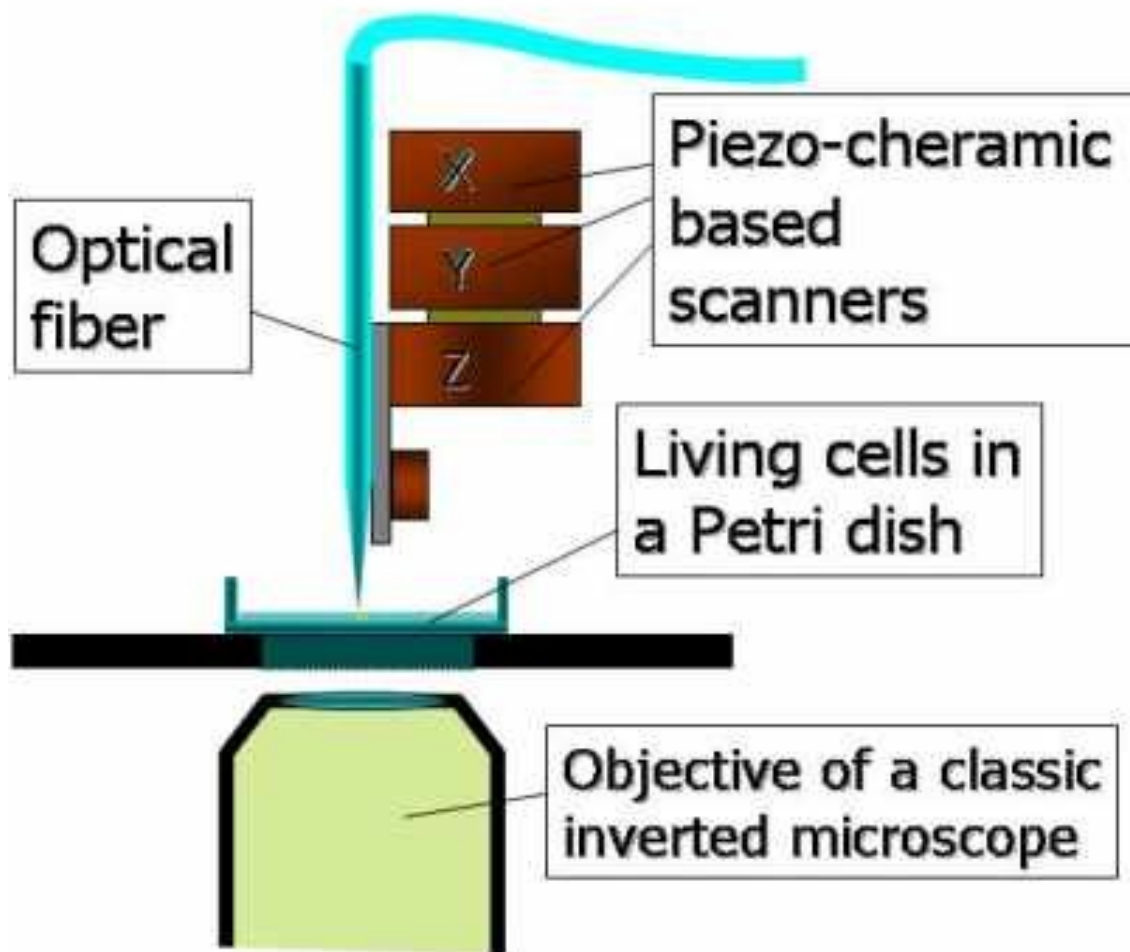
NSOM Schematic

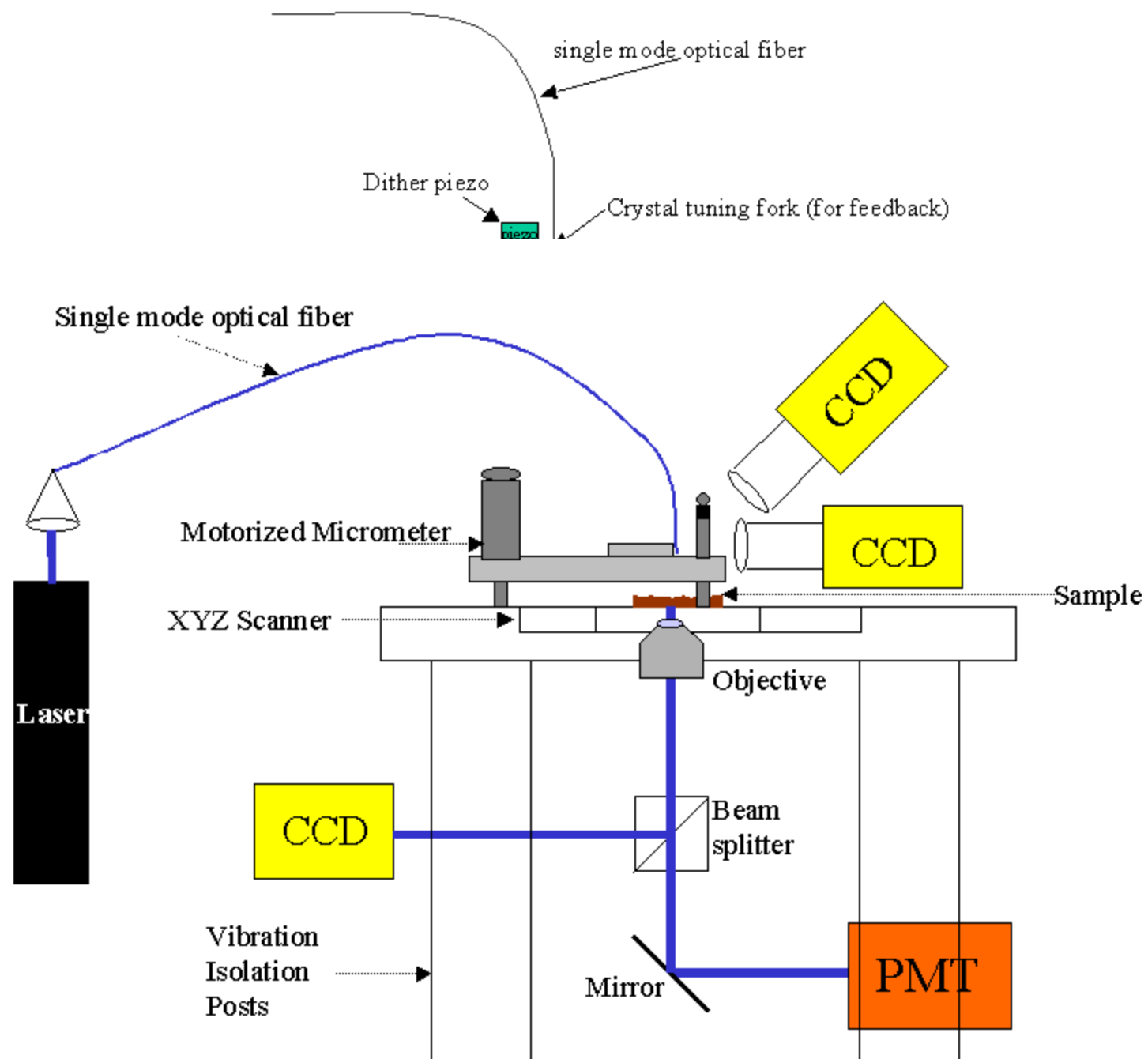


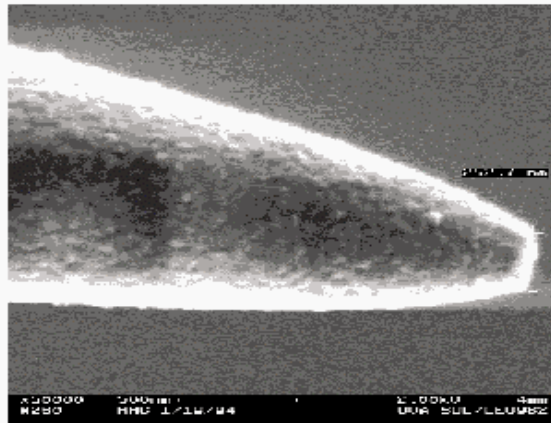
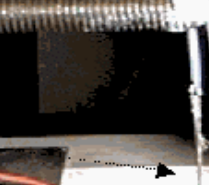
- Configurazione sperimentale per il NSOM.
- La luce laser accoppiata passa lungo una fibra ottica ed esce da un'apertura di lunghezza inferiore alla lunghezza d'onda alla fine della fibra.
- La luce trasmessa o l'emissione di fluorescenza indotta viene raccolta da un obiettivo e portata su un rivelatore.
- L'immagine si forma scannerizzando il campione e registrando l'intensità della luce raccolta in funzione della posizione di scanning.

•Sistema SNOM



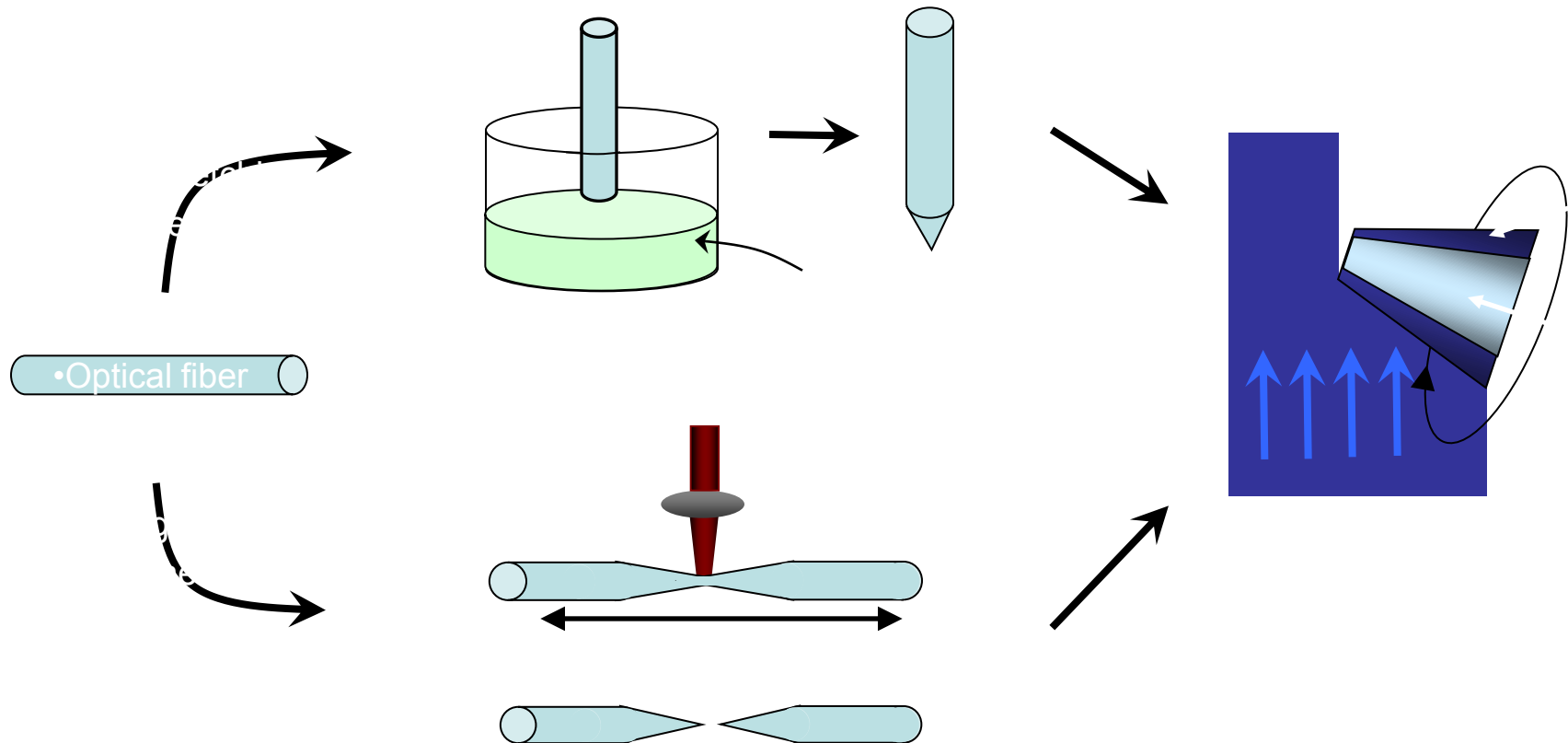






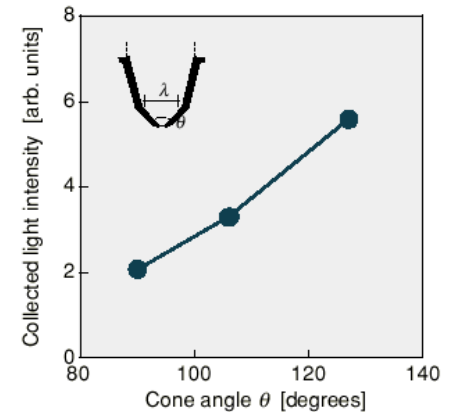
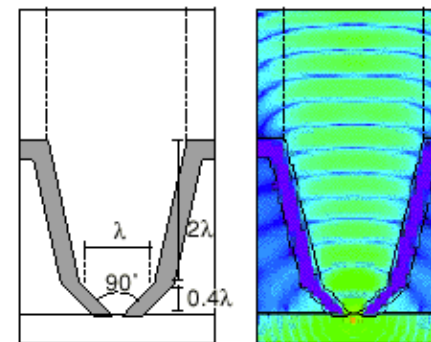
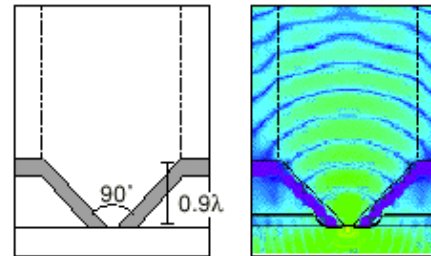
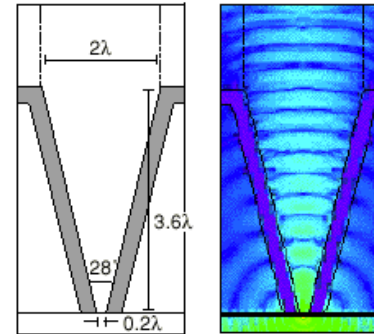
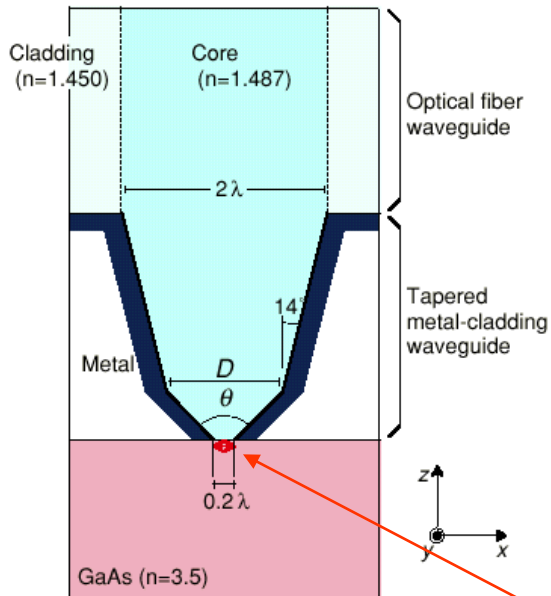
100 nm

Punte SNOM



Punte SNOM

Calcolo della distribuzione
del campo elettrico come
funzione della geometria
della punta.

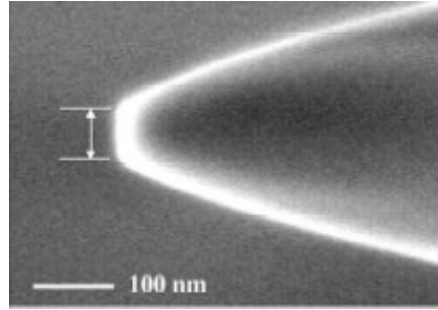
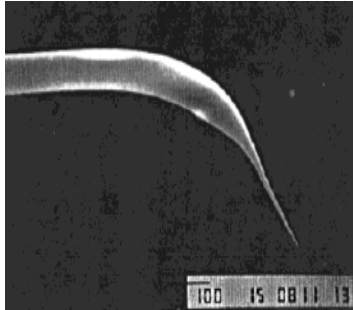
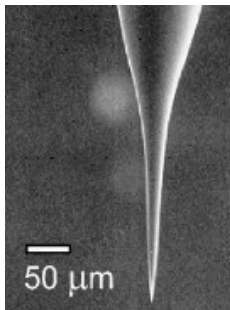
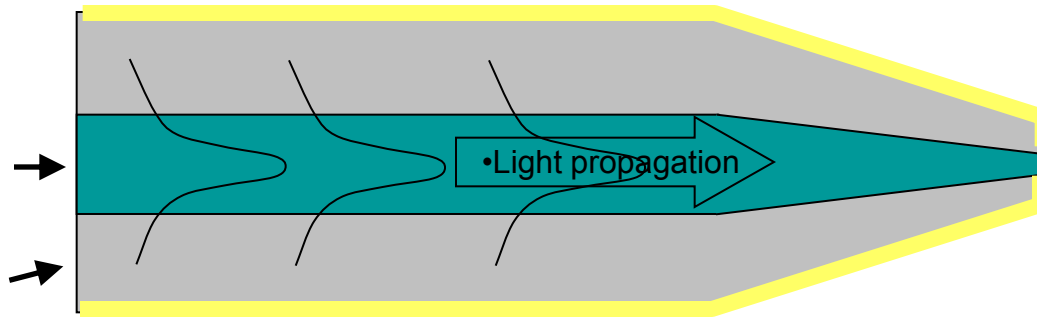


- Sorgente: InAs Qdot
- Sorgente puntiforme $\lambda/40$ sotto la superficie

•Aperture SNOM

- SNOM tips - pulling

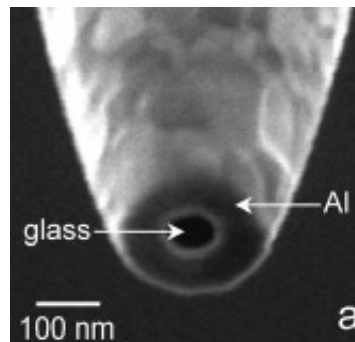
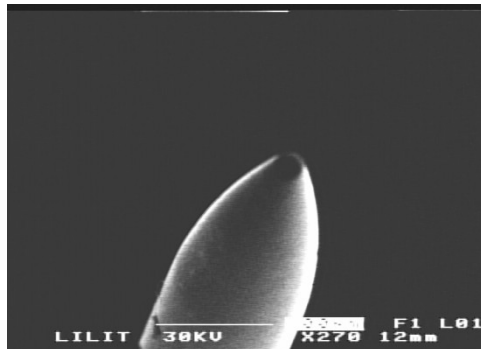
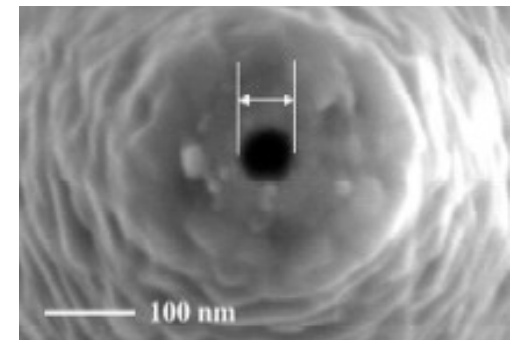
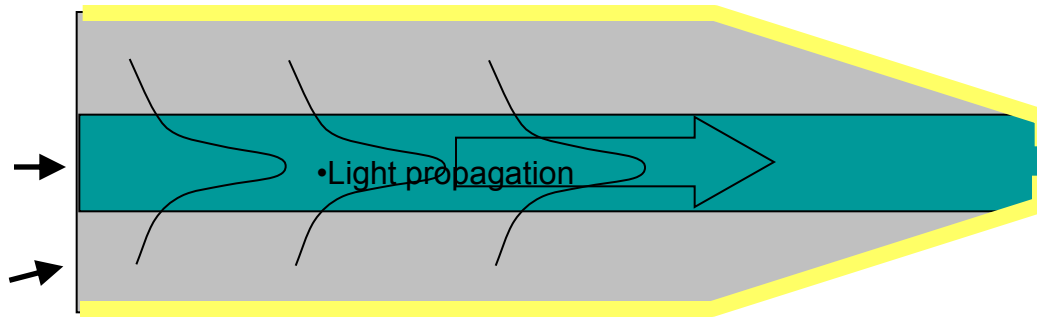
- Metal coating



•Aperture SNOM

- SNOM tips - etching

- Metal coating

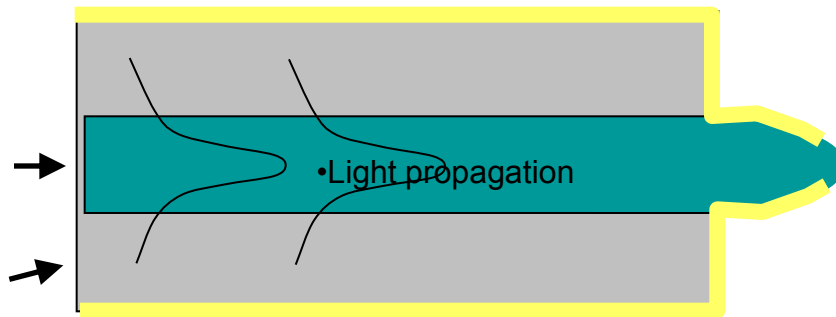


- Holes are dug by various methods:
- The best results are obtained by FIB

•Aperture SNOM

• SNOM tips - polymerization

•Metal coating



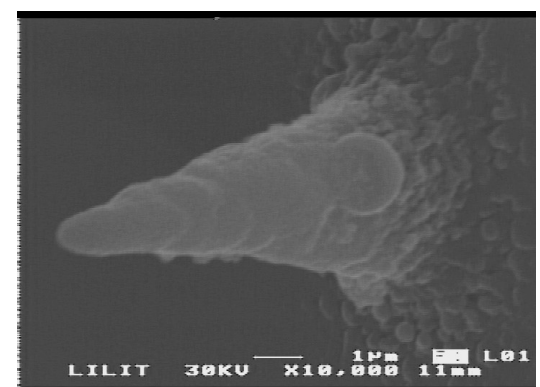
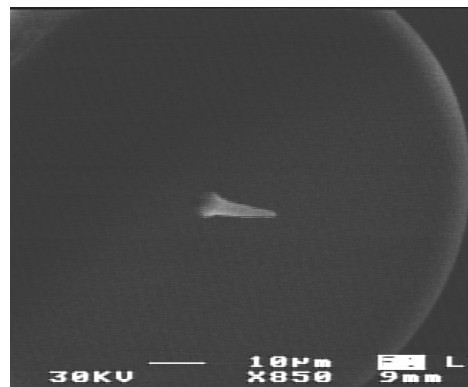
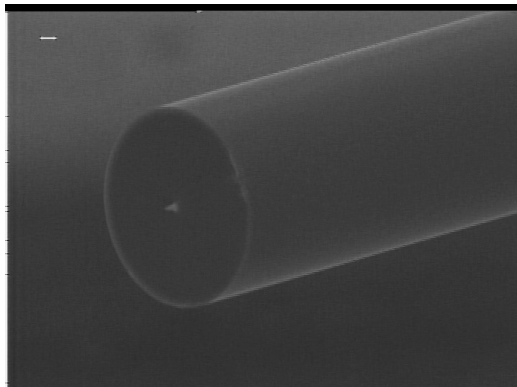
• Photopolymerization

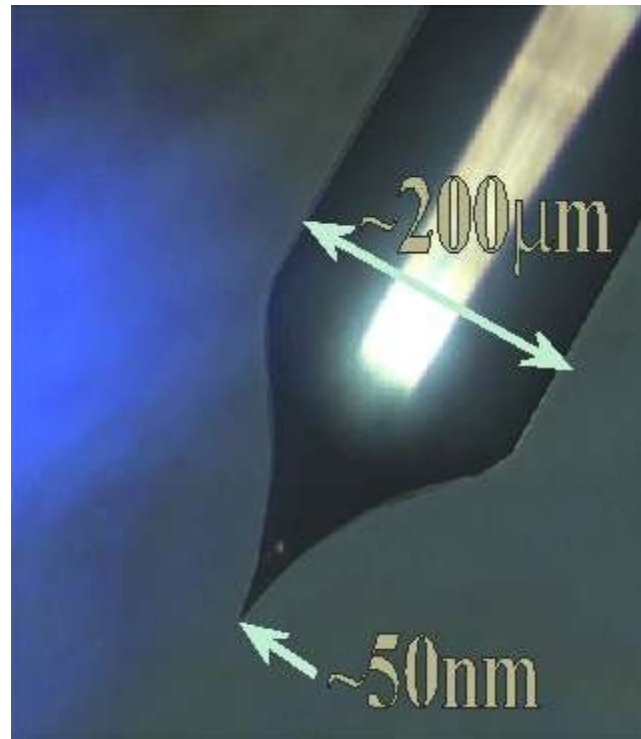
•90% wt Pentaerythritol triacrylate (monomer)

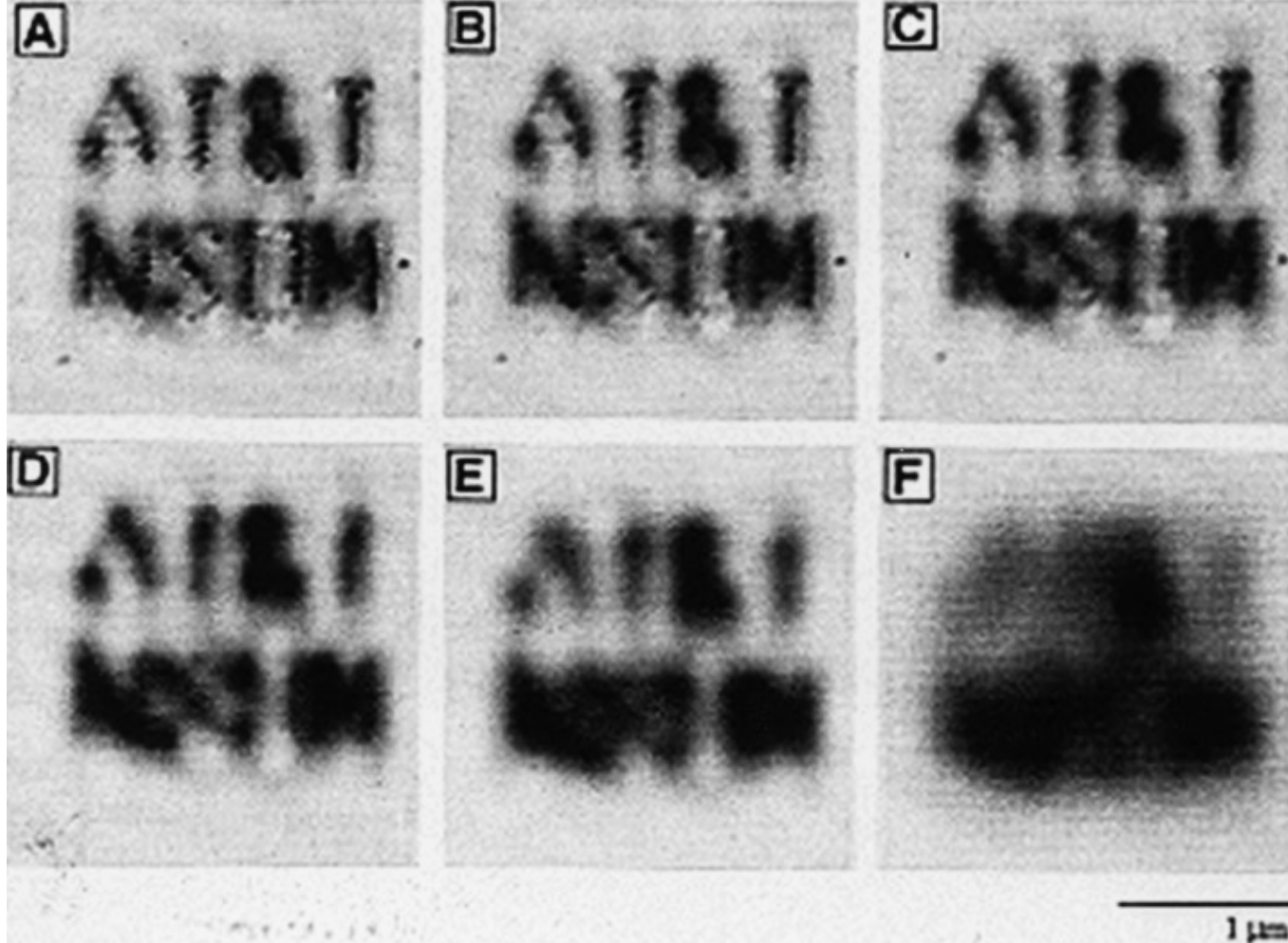
• 8% wt methyldiethanolamine (cosynergist)

• 2% wt eosin (dye)

•High sensitivity to the argon laser light (514 nm)





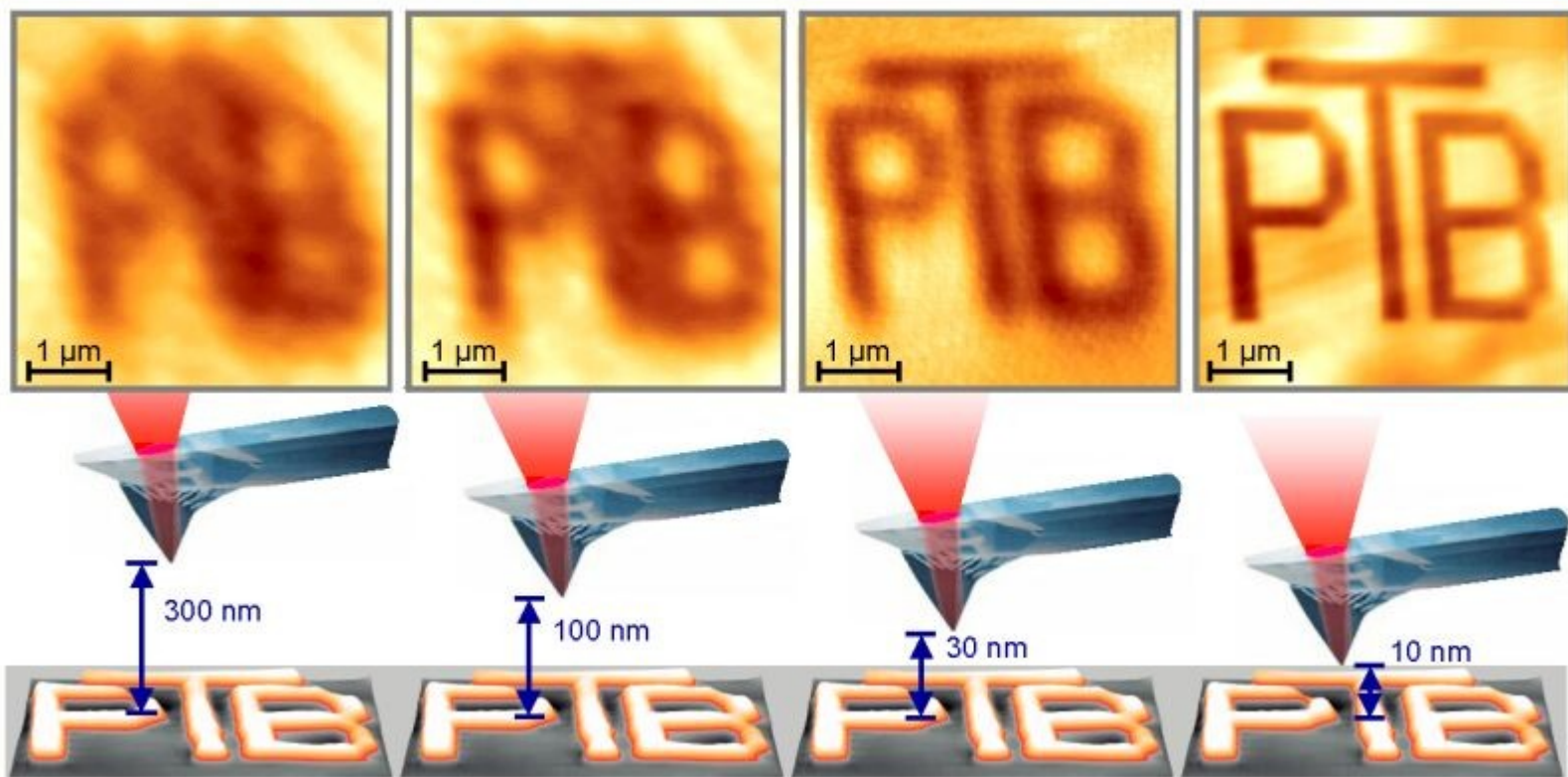


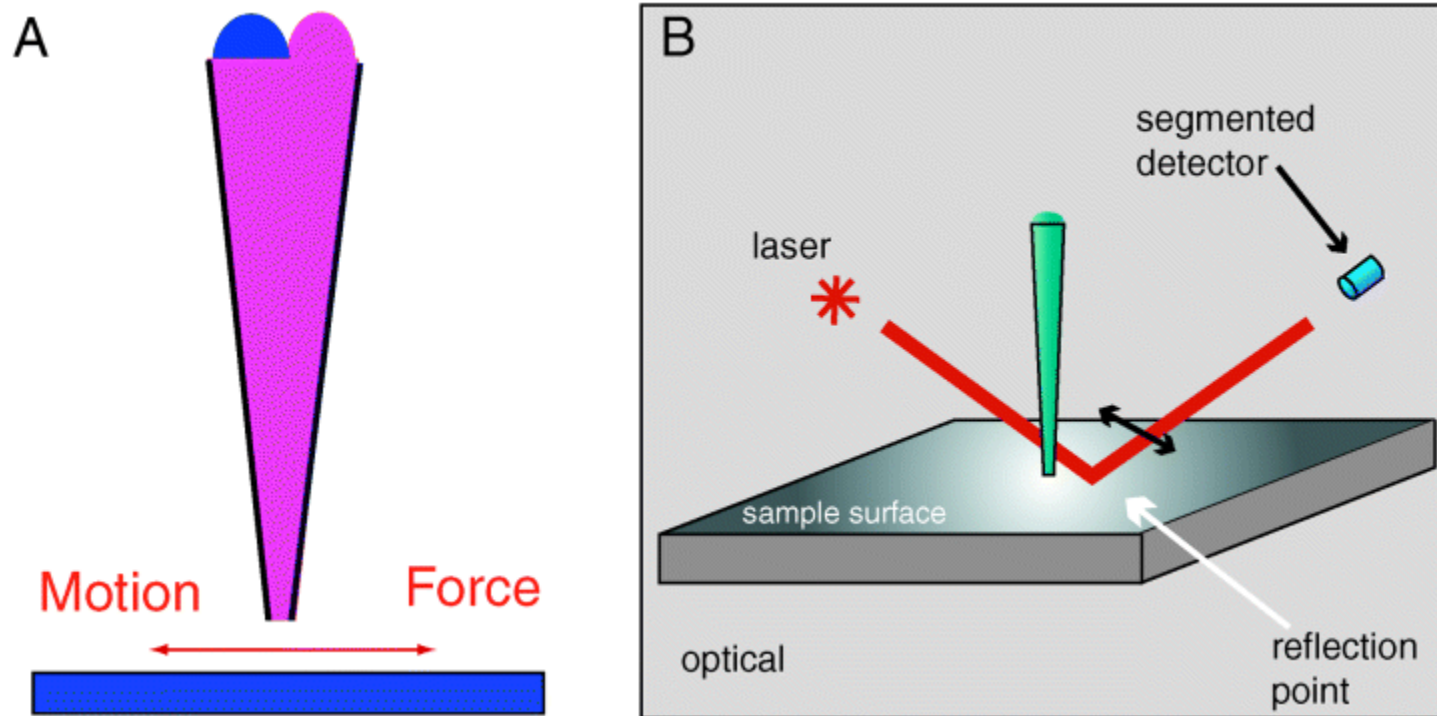
Risoluzione di Near-field in funzione della distanza dal campione.

Una punta NSOM in modo di trasmissione viene portata a contatto con un pattern di test.

A, l'immagine è fatta per contatto.

B–F mostrano immagini fatte con la punta progressivamente allontanata dal pattern. Le serie di step (B–F) sono 5, 10, 25, 100 and 400 nm.





Forza trasversale

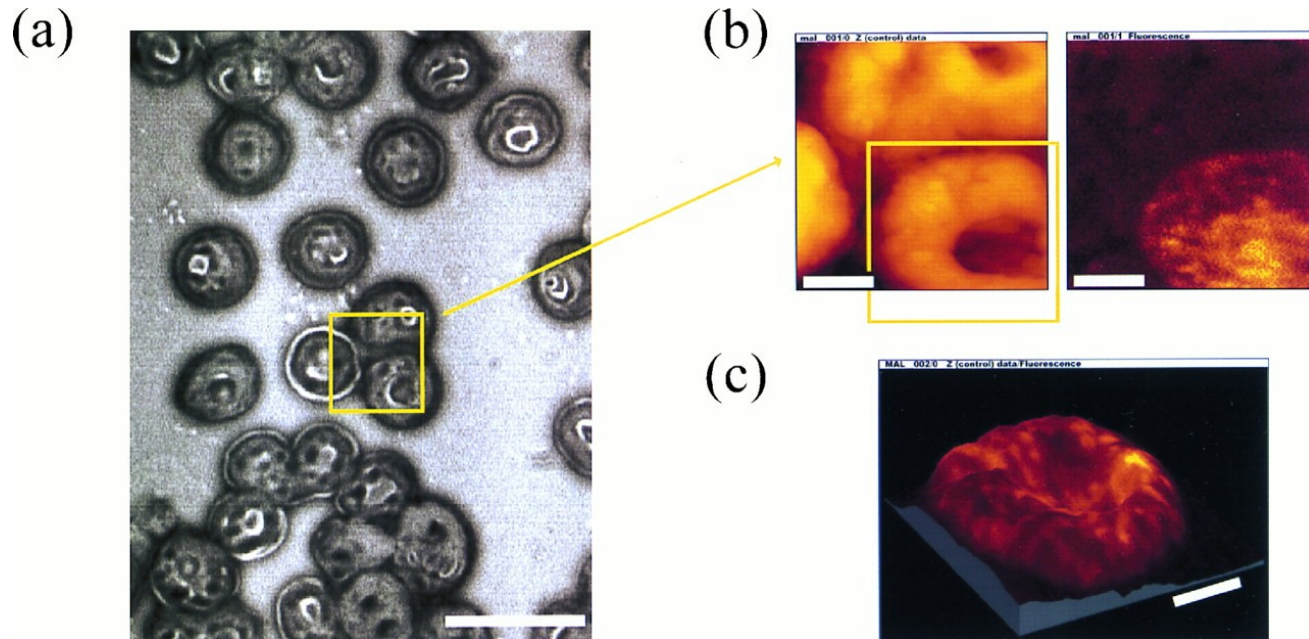
(A) Direzione di oscillazione della punta

(B) Rilevazione ottica dei cambiamenti nella vibrazione della punta.

La luce laser viene scatterata dalla punta su un rivelatore che è sensibile ai cambiamenti in ampiezza.

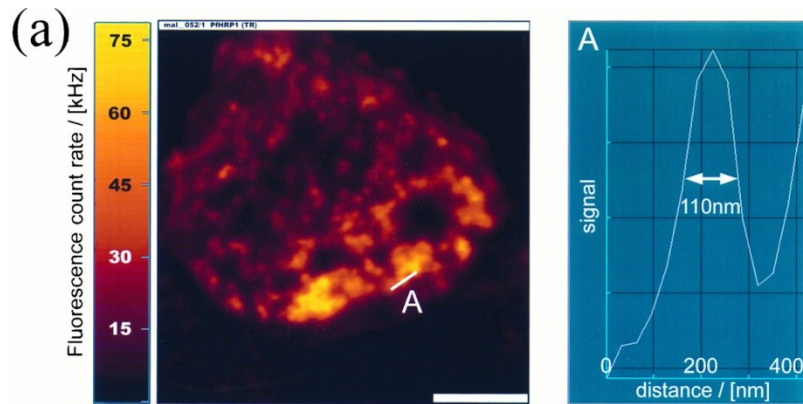
•Aperture SNOM

• Application1: blood cell with malaria disease



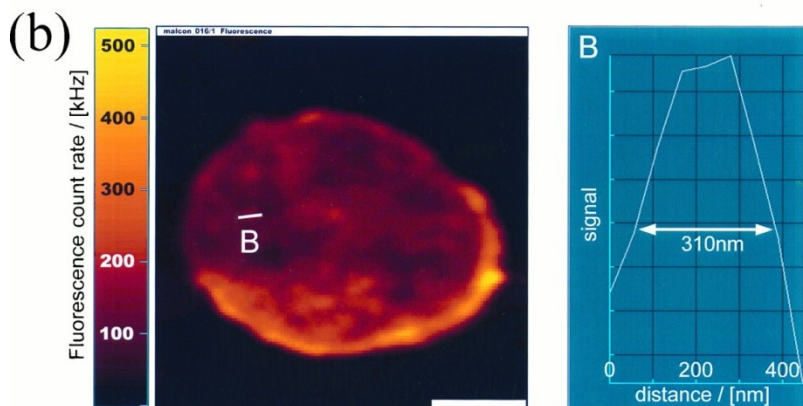
- Study of blood cells infected by malaria's plasmodium falciparum.(PF)
- Pf expresses several proteins in particular PfHRP1 and MESA that are fixed on the cell membrane.
- Proteins on cell membrane are colored with specific antibody marked with a red and a green fluorophor
- Here PfHRP1 is marked red

- Application1: blood cell with malaria disease



- Comparison between SNOM and confocal microscope images in the same blood cell:

- SNOM is sensitive to cell surface



- CM images a plane section at the focal plane

- Cellular structure is resolved on the SNOM image but not in CF image