

## 配置程控样品台的原子力显微镜重定位成像方法\*

唐雨钊<sup>1</sup> 张晓东<sup>1\*</sup> 孙洁林<sup>1</sup> 胡 钧<sup>1,2</sup>

(1. 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(2. 中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

**摘要** 原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy) 已成为在纳米尺度对样品进行观察和操纵的重要工具。基于原子力显微镜观测的重定位技术提供一种微观区域内对样品处理前后原位对比观测的方法。本文利用坐标实时显示的程控高精度样品台系统, 联合使用表面双标记定位法, 建立一种新的重定位方法, 方便、高效地实现样品重定位 AFM 成像。

**关键词** 原子力显微镜 重定位成像 表面标记 程控高精度样品台系统

## 引言

1986年, Binnig Quate 和 Gerber 发明原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy)<sup>[1]</sup>, AFM 的发明使得非导电样品表面的原子级分辨率形貌表征成为现实。原子力显微镜利用针尖与样品之间的相互作用力成像, 其工作原理是: 将一条对力极敏感的微悬臂一端固定, 另一端有一个微小针尖, 当针尖与样品表面足够靠近时, 针尖尖端原子与样品表面原子之间产生极微弱的作用力, 从而导致微悬臂发生偏折。通过激光检测微悬臂的偏折即可获得样品表面形貌的三维信息。相对于其他扫描探针显微镜, 原子力显微镜具有以下特点和优势: 样品制备简单, 对样品破坏性小; 可以在多种环境下直接成像; 能对活细胞进行实时动态观察; 能提供生物分子和生物表面纳米尺度分辨率三维图像; 可以测量生物大分子间如受体和配体相互作用力; 能对单个生物分子进行操纵, 如可对 DNA 分子进行切割, 拾取等; 由 AFM 获得的信息能与其他分析技术和显微镜技术互补。正因为 AFM 自身这些特点和优势, 使其迅速地在各个领域得到广泛应用。

在运用 AFM 过程中, 很多情况下, 需对样品进行原位多次成像。例如对样品先观测, 再进行一定处理, 然后再观测处理对样品的影响; 或者在液体中对样品进行长时间的实时原位观测, 从而研究样品的实时变化。由于再次安装样品时位置不可避免地发生变化, 或者长时间实时观测过程中仪器的不断热漂移, 都需要对原成像位置进行重定位。与光镜和电镜相比, AFM 由于扫描头可变化范围的限制, 视域较小, 通常在数十微米以内, 因此运用 AFM 进

行重定位成像是困难的。目前就 AFM 重定位成像已经发展一些方法, 如单个样品的 AFM 重定位成像<sup>[2-6]</sup>, 通常是在透明样品衬底背面固定精细标记, 通过 CCD 成像, 将 AFM 针尖对准精细标记实现重定位。但这一方法每次只能定位一个区域, 对表面标记有较高要求, 样品衬底也必须透明, 且只能在表面标记很近的区域成像。

本文发展一种新的用于 AFM 观测的重定位方法, 利用配置 CCD 摄像头和程控高精度移动样品台的 Nanoman 型 AFM, 联合使用双表面标记定位法, 可快速、方便地实现样品的精确重定位。实验中以 AFM 针尖蚀刻云母表面并做为模板进行聚合物复型。用 Hard-PDMS 做为复型材料, 复型后对模板进行重定位成像, 比较模板在同一区域复型前后的形貌变化。

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器与材料

原子力显微镜 Nanoman (VEECO, USA), 配置 Nanoscope IV 控制器和 D3100 控制器。该仪器中, 扫描管带动 AFM 探针在样品上方进行扫描成像 (见图 1a), 与 Multimode 型 (Veeco USA) AFM 仪器中扫描管带动样品移动进行扫描的方式完全不同。样品放置在下方的程控高精度样品台上, 由两个精密马达控制 X, Y 向的移动, 最小移动单位为 0.1 $\mu$ m。样品的成像位置以坐标值的形式, 在操作程序中实时显示。实验成像方式为空气中轻敲模式 (Tapping mode) 成像, 扫描探针为 Nanosensor 针尖 (弹性系数 ~ 40N/m)。以 Hard-PDMS (Gelest USA) 和 PDMS (Sylgard 184 Dow Corning, USA) 为复型材料。云母购自四川雅安云母有限公司。

基金项目: 本文得到国家自然科学基金 (10304011), 上海市科委纳米专项 (0452nm007, 0552nm027) 资助。

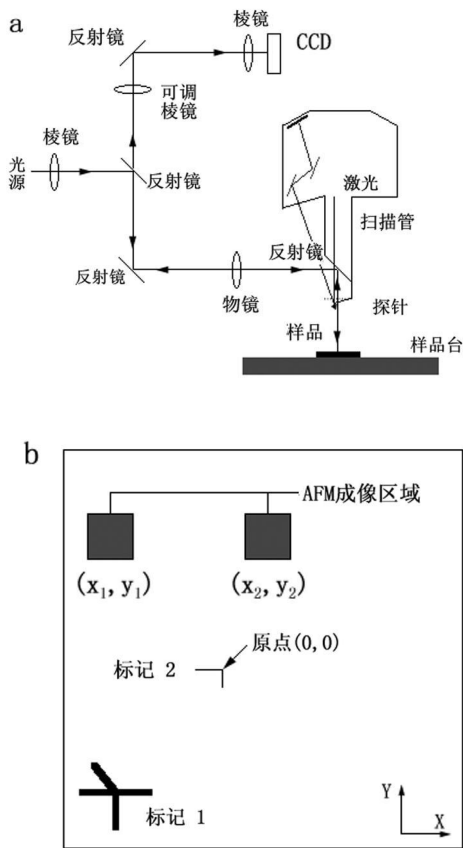


图 1 (a)所用 AFM 仪器示意图;  
(b)成像区域与表面标记对应关系示意图。

## 1.2 样品上双标记符号的制作

用镊子在新鲜剥离的云母表面远离中心区域的地方,轻轻手划非对称交叉形标记(记为标记 1),该标记的中心用来作为微标记(记为标记 2)的坐标参照点。制作标记 2 之前,首先将 AFM 探针顶端与 CCD 十字准星中心对齐(见图 2a),然后移动样品台,寻找云母模板上的标记 1 并聚焦,调整样品台,使标记 1 的水平划痕平行 X 轴,且标记 1 的中心与 CCD 显示屏准星的交叉点重合,如图 2b 左下图所示。此时以标记 1 中心为原点,移动样品台至样品中心区域附近,记下此时的坐标值  $(X_0, Y_0)$ ,进行标记 2 的制作:首先将一硬针尖(弹性系数  $> 40\text{N/m}$ )下压接触云母表面,然后移动样品台,刻画两条垂直的长约  $300\mu\text{m}$  和  $200\mu\text{m}$  的沟槽,即作为微标记。

## 1.3 纳米刻蚀图样的制作

将刻好的标记 2 与 CCD 准星聚焦并对齐,以标记 2 互相垂直的两条刻痕分别为 X, Y 轴(见图 2b),重设交点为中心原点,然后在区域  $(X_1, Y_1)$ ,  $(X_2, Y_2)$  内(见图 1b),运行纳米刻蚀程序(Nano-script)刻蚀图样,并对刻蚀后图样成像。

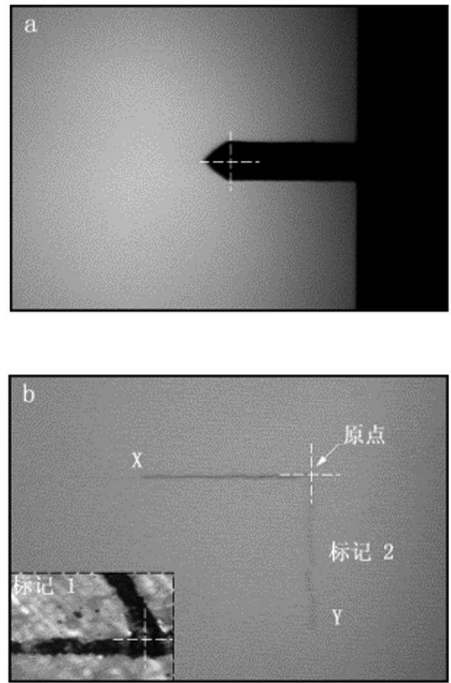


图 2 CCD 显示的重定位坐标原点确定过程

(a)悬臂顶端与 CCD 显示屏上准星中心对齐;(b)左下为标记 1,以标记 1 中心为原点建立坐标系进行微标记。标记 2 为微标记,以互相垂直的两条刻痕为 X, Y 轴,以刻痕的交点为原点建立 AFM 成像区域的坐标系。

## 1.4 聚合物复型

将配好的 Hard-PDMS 浇注在上述刻蚀有图样的云母表面,立即以  $\sim 1000\text{rpm}$  旋转  $\sim 1\text{min}$  放在恒温箱中  $60^\circ\text{C}$  固化  $5\text{min}$  后,再浇注配好的 PDMS(主剂与交联剂质量比 = 10:1)。脱气  $20\text{min}$  后,放入恒温箱中  $60^\circ\text{C}$  固化  $2\text{h}$ 。固化后,从云母表面揭离 PDMS 图章,对原云母模板进行 AFM 重定位成像,观测复型处理后云母表面刻蚀图样区域的变化。

## 1.5 重定位成像方法

实验中采用双标记法实现重定位。如图 1b 所示,标记 1、标记 2 和待测区域在样品的第一次成像中已通过样品台系统精确定位。重定位时只要准确找到标记 1,即可设定坐标快速地找到标记 2 再次设定坐标即可找到样品成像区域。

## 2 结果

在云母的两个区域  $(X_1, Y_1)$ ,  $(X_2, Y_2)$  进行纳米刻蚀,刻蚀图案设计为四条分别长  $4\mu\text{m}$ ,  $3\mu\text{m}$ ,  $2\mu\text{m}$ ,  $1\mu\text{m}$  的直线,以间隔  $1\mu\text{m}$  排列,刻蚀顺序为从左至右。对该两个区域的刻蚀图样进行的第一次 AFM 成像结果(见图 3a-3c)。其中区域 1(见图 3a),运行刻蚀文件 3 次,沟槽深度和宽度都不均匀,且沟槽边缘存在少量刻蚀云母产生的碎屑。区域 2

(见图 3c)为调整刻蚀文件参数后,经一次刻蚀后形成的图案。第一条刻蚀线没有刻出沟槽,其他沟槽宽度和深度较为均一,碎屑相对较少。

对复型后的云母进行重定位成像时,首先在 CCD 下找到标记 1,由标记 1 找到标记 2。由于样品是重新上样,因此标记 1 的水平划痕有可能是斜的,此时必须旋转和调整样品台,使复型后云母的标记 1 的水平划痕与 CCD 准星的水平线完全重合,且标记 1 的交叉点与准星交叉点重合。根据第一次成像时的坐标值  $(X_0, Y_0)$  移至微标记 2 处。再次微调样品方向,以标记 2 互相垂直的两条刻痕及交差点分

别与 CCD 准星对准,分别移动样品至  $(X_1, Y_1)$ ,  $(X_2, Y_2)$  完成对模板重定位的成像。得到图 3b 和图 3d。从图 3b 3d 可以看到, 3a 3c 中黑色箭头所指刻蚀时形成的云母颗粒碎屑经复型后,从模板上消失。可能是旋涂聚合物的过程中被带离模板,也可能是在揭离聚合物的时候被带走,而更多的小颗粒仍留在模板表面。在沟槽边缘的部分,可以看到有一些聚合物残留下来。沟槽以外的平整部分,没有聚合物残留。结果表明,运用表面双标记坐标定位法,方便、高效的实现重定位成像。

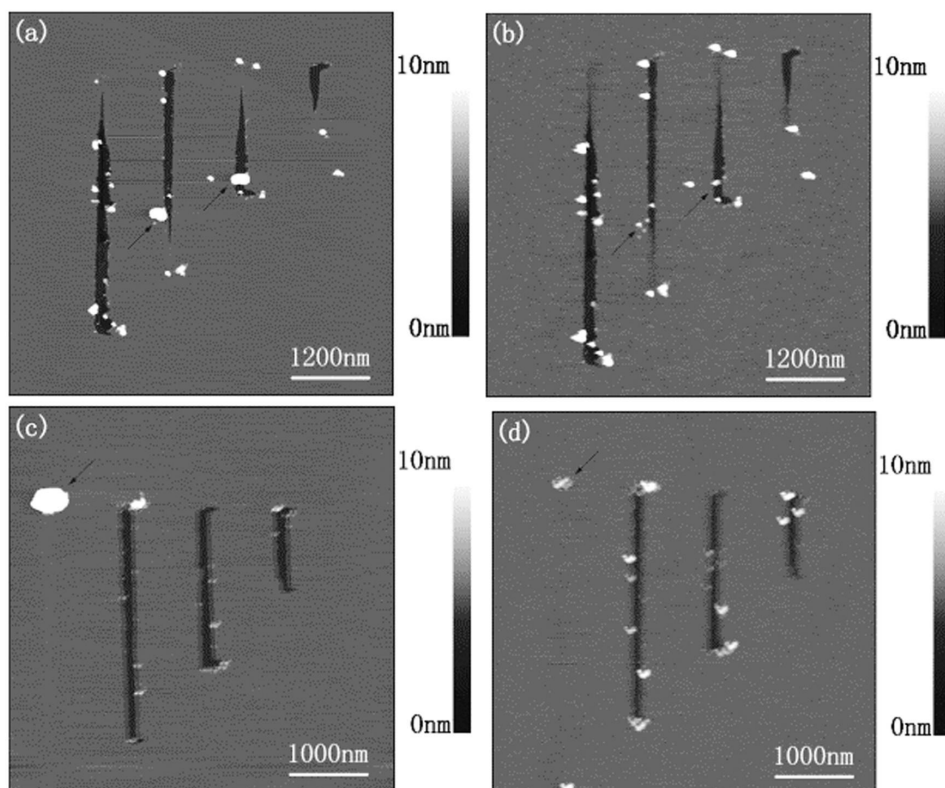


图 3 AFM 重定位观察结果

云母表面经 AFM 针尖纳米刻蚀的规则沟槽,图 (a), (c) 为模板两个独立区域在经聚合物复型前的形貌。图 (b), (d) 为模板复型后形貌。图中箭头所指颗粒在复型后从模板上消失。

### 3 讨论

本文运用样品正面双标记法,在偏离样品成像区域进行大标记,再在偏离大标记的区域,进行一次表面微标记。大标记的作用是用来寻找微标记,因为标记较大,通过 CCD 很容易找到大标记,再以大标记中心为原点建立的坐标系,找到微标记。如果没有大标记,寻找微标记的过程十分费时。用 AFM 探针以互相垂直的两条直线进行微标记,调整 CCD 准星中心与微标记中点(即两条直线的交点)重合,从而控制样品的移动位置和移动角度。结合程控高

精度样品移动平台的坐标实时显示功能,对扫描区域进行坐标定位,最终实现精确的重定位成像。重定位的误差来源有,在微标记与 CCD 中心配准时,会有一定的配准误差,其中角度偏移误差影响较大。另外,定位时也存在机械误差,如移动平台误差为  $2 \sim 6 \mu\text{m}$ 。通过 CCD 放大功能,放大微标记,从而减小配准误差。减小样品台移动范围可以减少移动误差;在 AFM 成像时,通过增大扫描范围也能够克服机械误差带来的影响。

本文的方法要求 AFM 配置程控高精度样品台系统,主要是为在大面积范围内进行坐标实时定位,

其中 Veeco 公司的 D3100 和 NanoM an 型号可以满足此要求。如果 AFM 检测时依靠手动来移动样品台,则坐标位置不能实时显示,本文发展的重定位方法也就难以实现。

#### 4 结论

相对于已知的重定位方法,本方法无需在样品扫描区域作精细的多处标记,从而避免对样品待扫描区域的破坏,而且只要作一次表面标记即可对样品表面的多个区域进行重定位成像,这对于贵重模板的重定位成像很重要。另外,本方法对样品和衬底的透明度没有要求,适用样品的最大尺寸(直径)达 15 $\mu\text{m}$ ,对大样品的重定位成像尤其实用。

#### 参考文献

1 Binnig G., C. Quate and C. Gerber, Atomic force microscope Phys. Rev. Lett 1986, 56: 930~933

- 2 Tumer, D. C., et al, Use of a repositionable substrate to acquire and compare distinct atomic force microscope images of a field of microtubules. Ultramicroscopy, 1995, 58(3~4): 425~434
- 3 Markiewicz P. and M. C. Goh, Identifying locations on a substrate for the repeated positioning of AFM samples. Ultramicroscopy, 1997, 68(4): 215~221
- 4 R Gahlia R., S. Jacobson, and R. Larker, Wear volume and wear distribution of hydraulic motor cam rollers studied by a novel atomic force microscope technique. Wear, 1998, 220(1): 1~8
- 5 Su M., Z. Pan and V. P. Dravid, A convenient and rapid sample repositioning approach for atomic force microscopy. Journal of Microscopy, 2004, 216(2): 194~196
- 6 Cao Y., et al, A multiwall carbon nanotube (MW CNT) relocation technique for atomic force microscopy (AFM) samples. Ultramicroscopy, 2005, 103(2): 103~108

### Reposition imaging technique of AFM with program-controlled sample stage

Tang Yuzhao<sup>1</sup> Zhang Xiaodong<sup>1</sup> Sun Jieli<sup>1</sup> Hu Jun<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200240)

(2. Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academic of Science, Shanghai 201800)

**Abstract** Atomic force microscopy (AFM) has been an important tool for observing and manipulating samples at nanometer scale. Reposition imaging technique of AFM provides a method to compare the differences between the former sample and the disposed sample at the same position. In this paper, an new accurate and efficient reposition imaging technique of AFM for multi-area has been developed by employing the AFM equipped with program-controlled high resolution sample stage system and using two surface marks in the sample.

**Key words** Atomic force microscope Reposition imaging Surface mark Program-controlled high resolution sample stage system

(上接第 24 页)

### Identification on chinese materia medica cape jasm ine by X-ray diffraction fourier fingerprint pattern method

Gong Ningbo<sup>1</sup> Zheng Xiaowei<sup>2</sup> Wang Gangli<sup>2</sup> Zhang Ji<sup>2</sup> Lu Yang<sup>1</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of

Medical Sciences, Beijing 100050)

(2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

**Abstract** To develop a new identification and analysis method for Traditional Chinese Medicine, the Powder X-ray Diffraction was used on nineteen different specimens for Cape Jasm ine. The reference X-ray diffraction Fourier Fingerprint Patterns and characteristic diffraction peaks of Cape Jasm ine and "Shu r Zhizi" were obtained by Powder X-ray Diffraction Fourier Fingerprint Pattern method. Identification result shows that Cape Jasm ine was well distinguished from the variation of Cape Jasm ine-"Shu r Zhizi", and the habitually prescribing medicinal materials-"Huanghua Zhizi". The Fourier Fingerprint Patterns and characteristic diffraction peaks can be used for identification and quality control of Traditional Chinese Medicine.

**Key words** Traditional chinese medicine X-Ray diffraction Fourier fingerprint pattern Cape jasm ine