

Современные методы микроскопии высокого разрешения в исследованиях полимерных структур

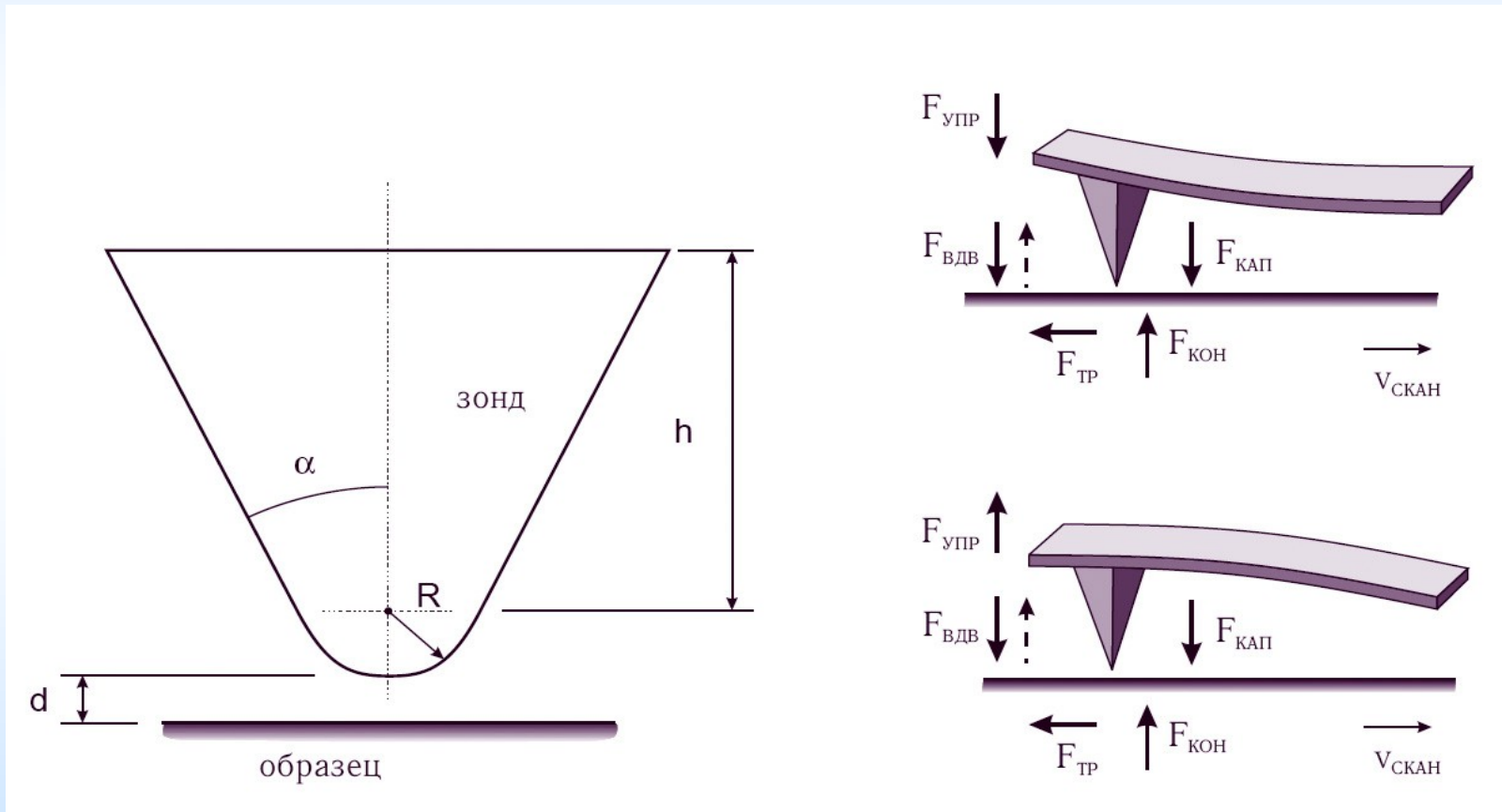
Галлямов Марат Олегович

Физический факультет
МГУ имени М.В. Ломоносова

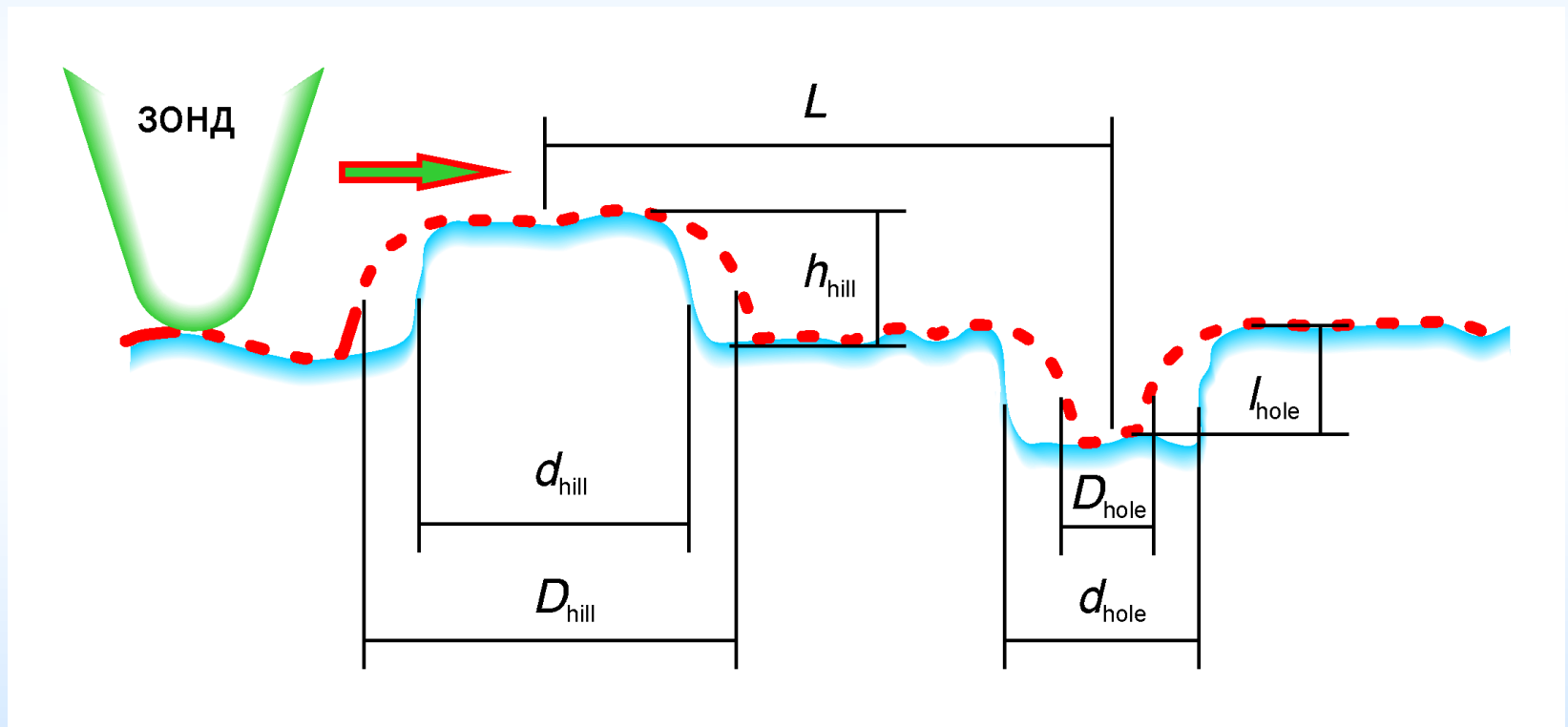
План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Сканирование, зонд, взаимодействие с образцом

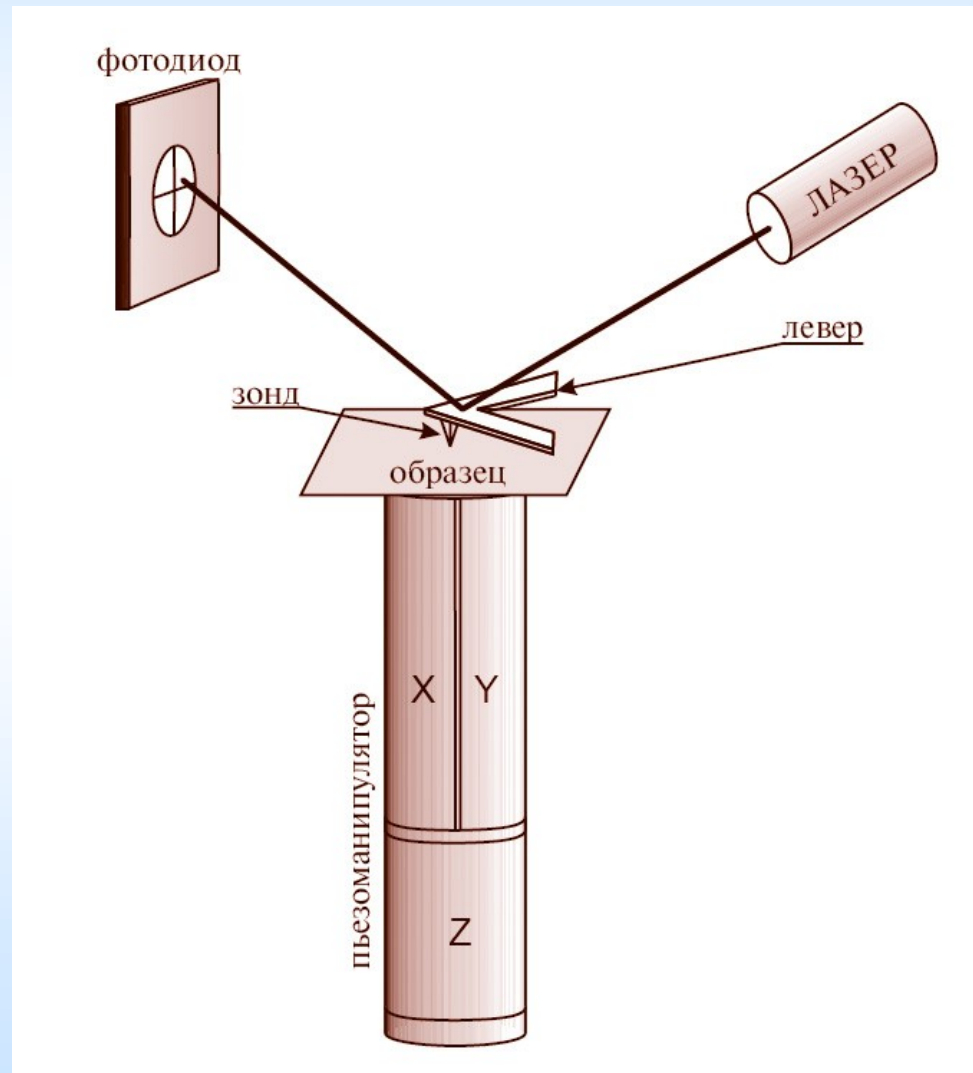


Движение зонда при сканировании

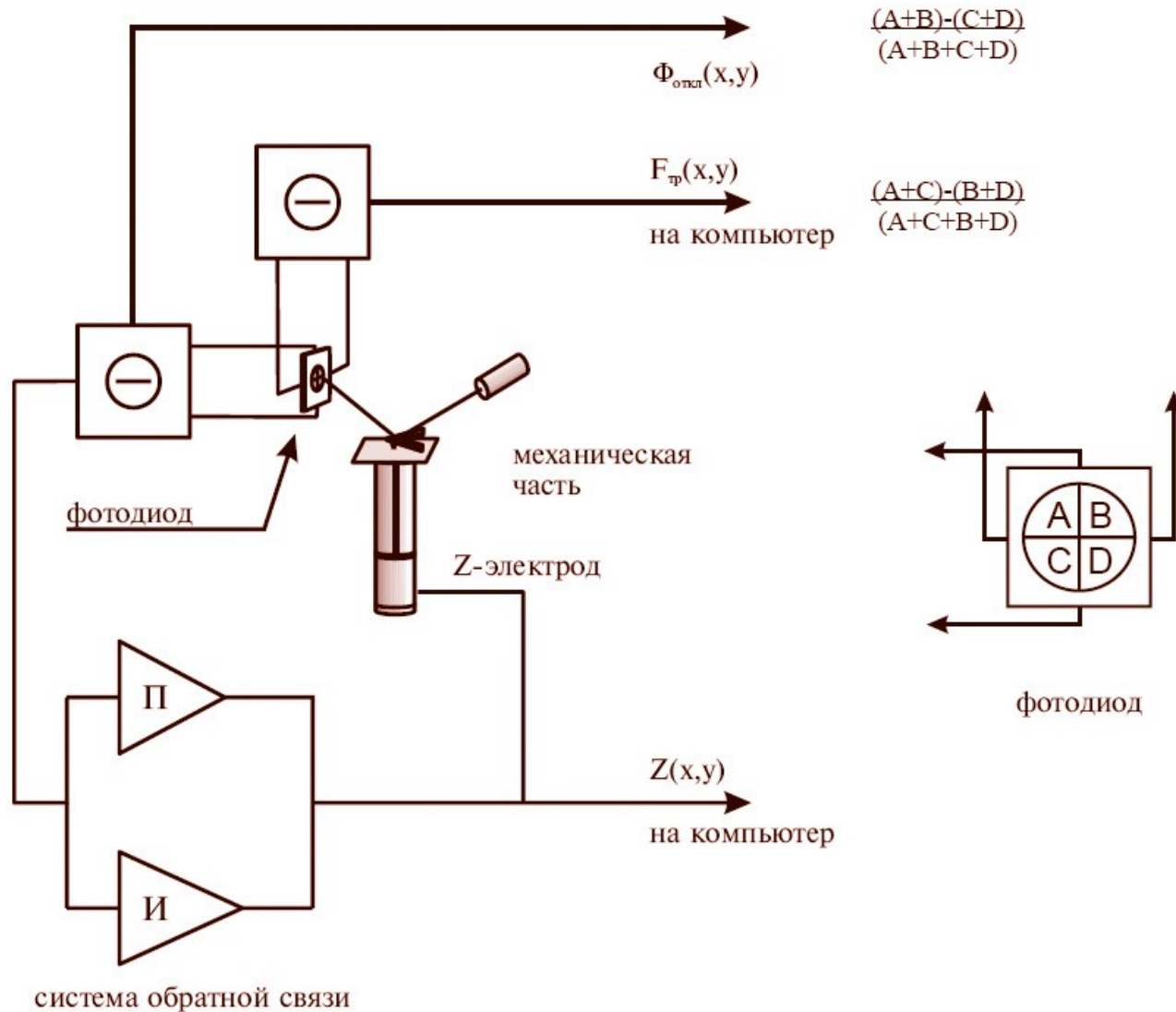


Интенсивность взаимодействия поддерживается постоянной

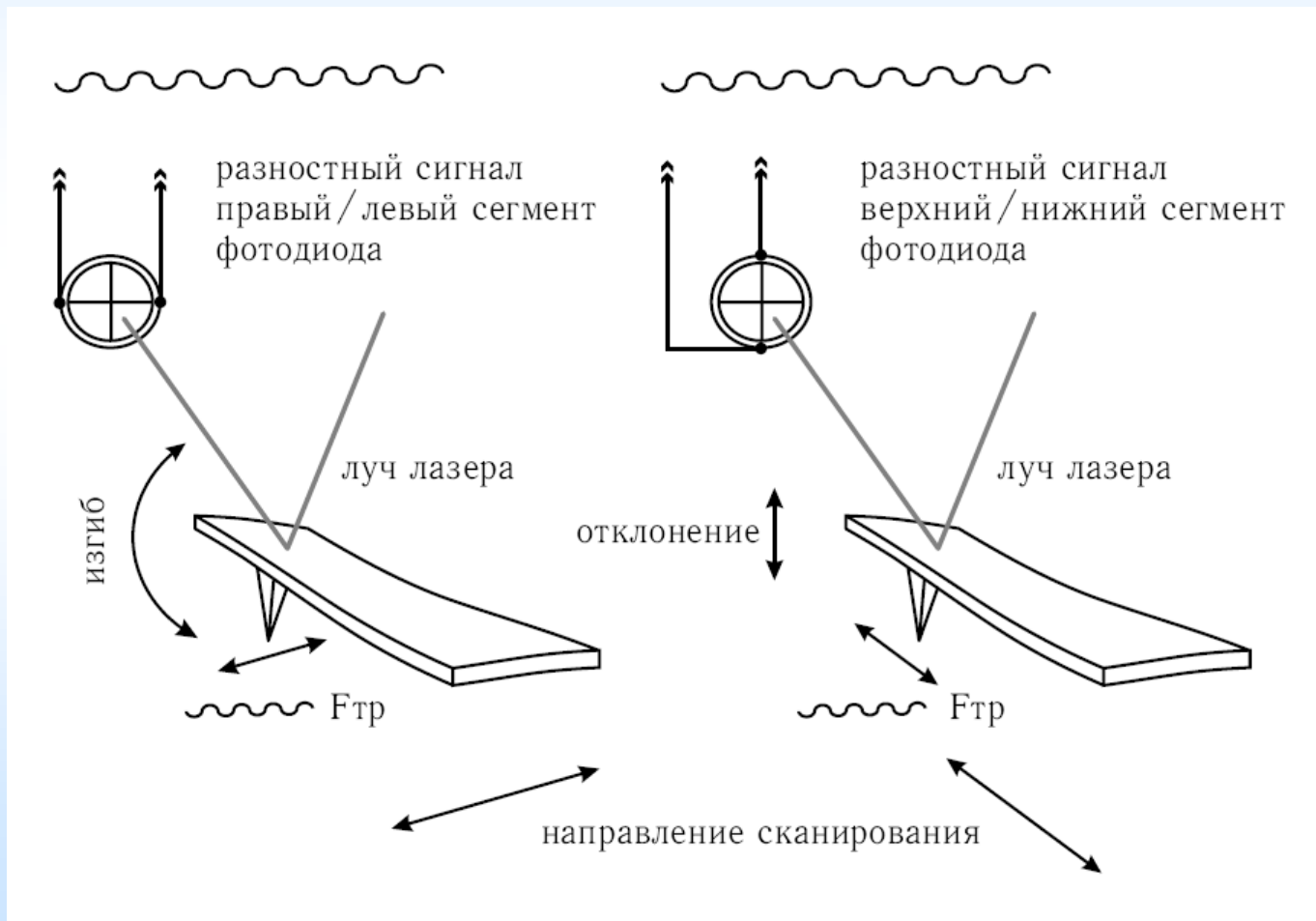
Измерение интенсивности взаимодействия



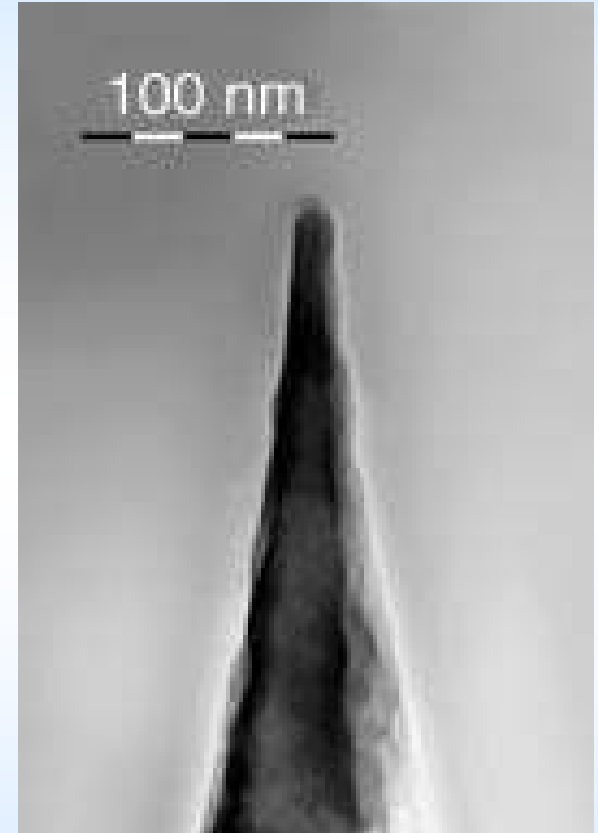
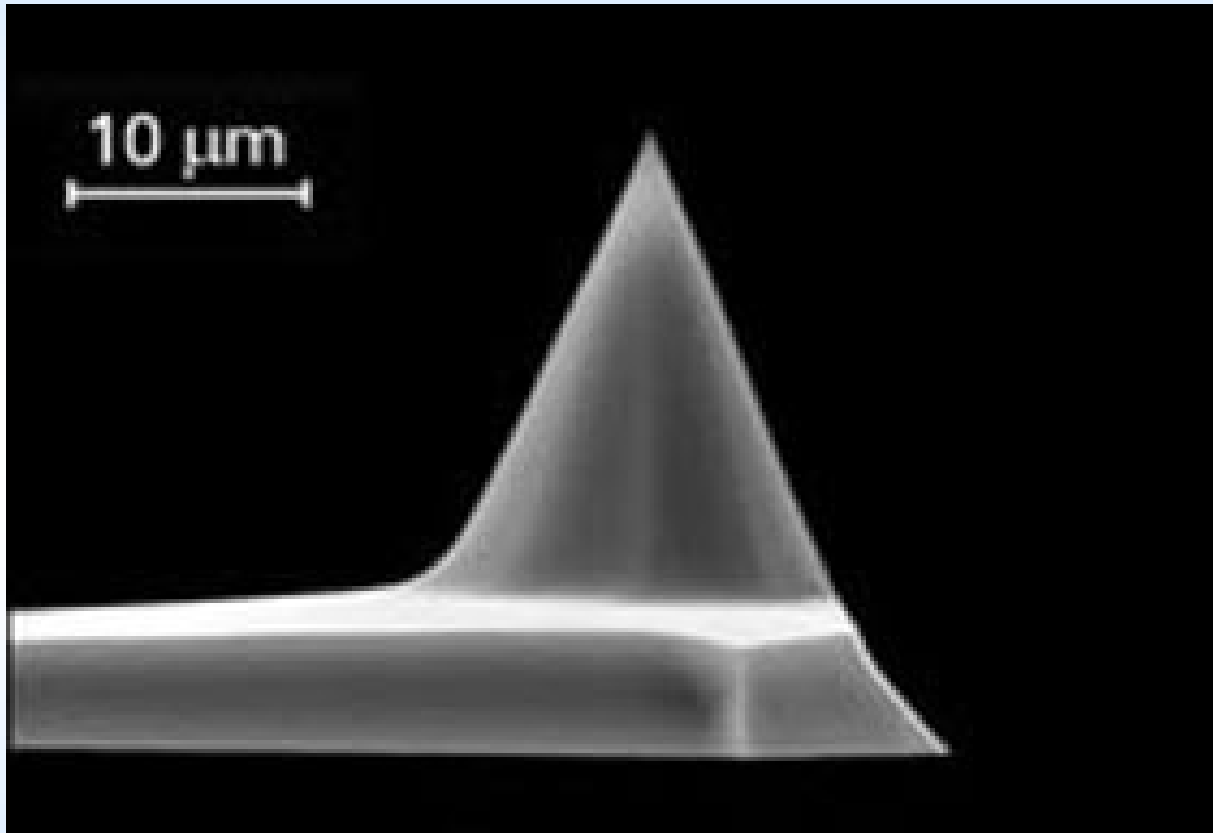
Система обратной связи



Измерение поверхностного распределения фрикционных свойств

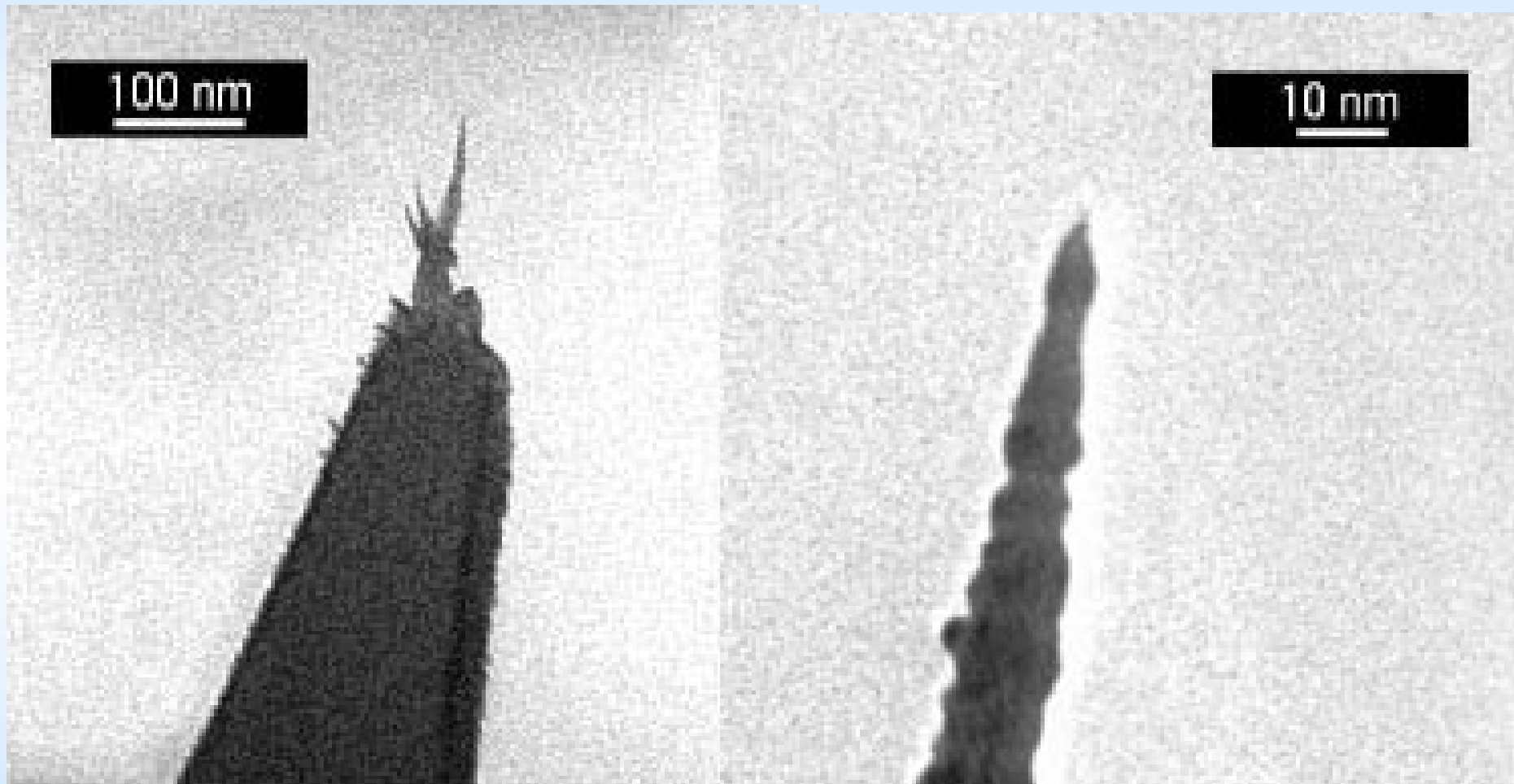


Игла кантилевера



Материал – кремний, травление, типичный радиус кривизны кончика – 10 нм

"Ультраострые" кантилеверы



Углеродная игла, типичный радиус кривизны кончика – 1 нм

План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - **Погрешности визуализации в ССМ**
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Результат построения изображений в ССМ

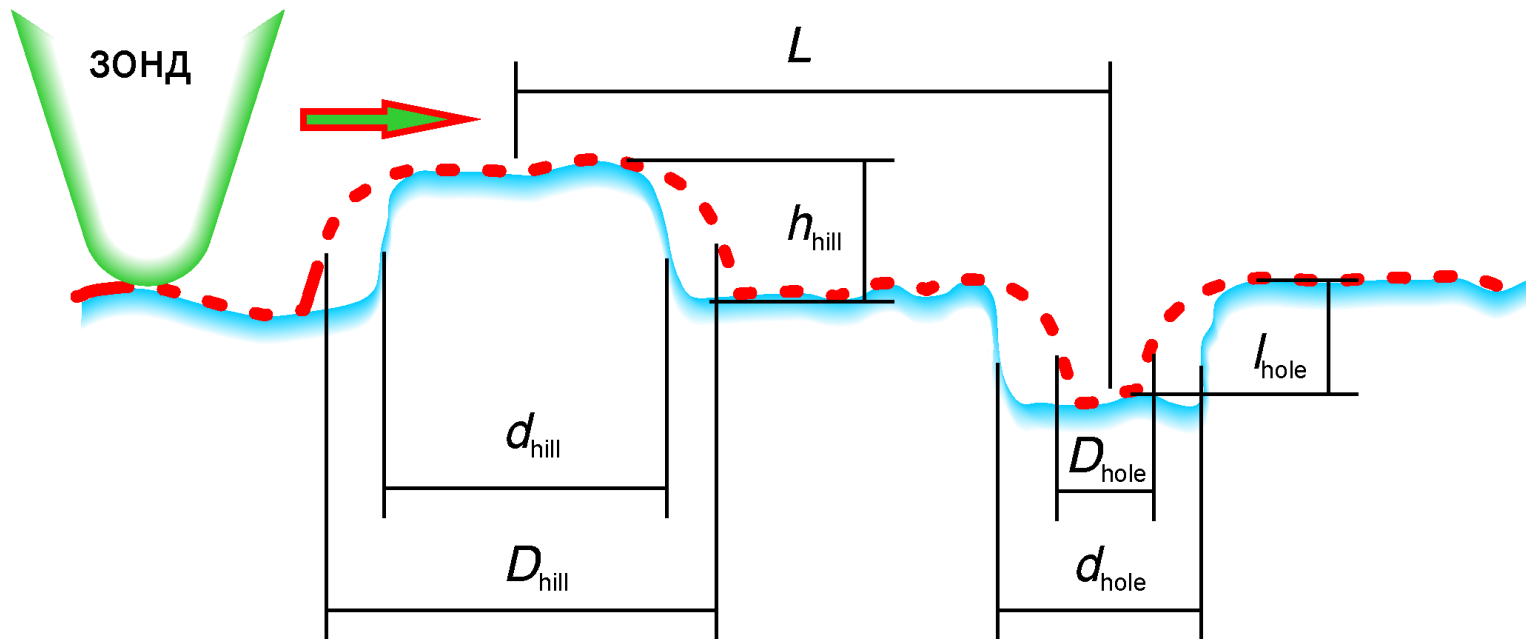
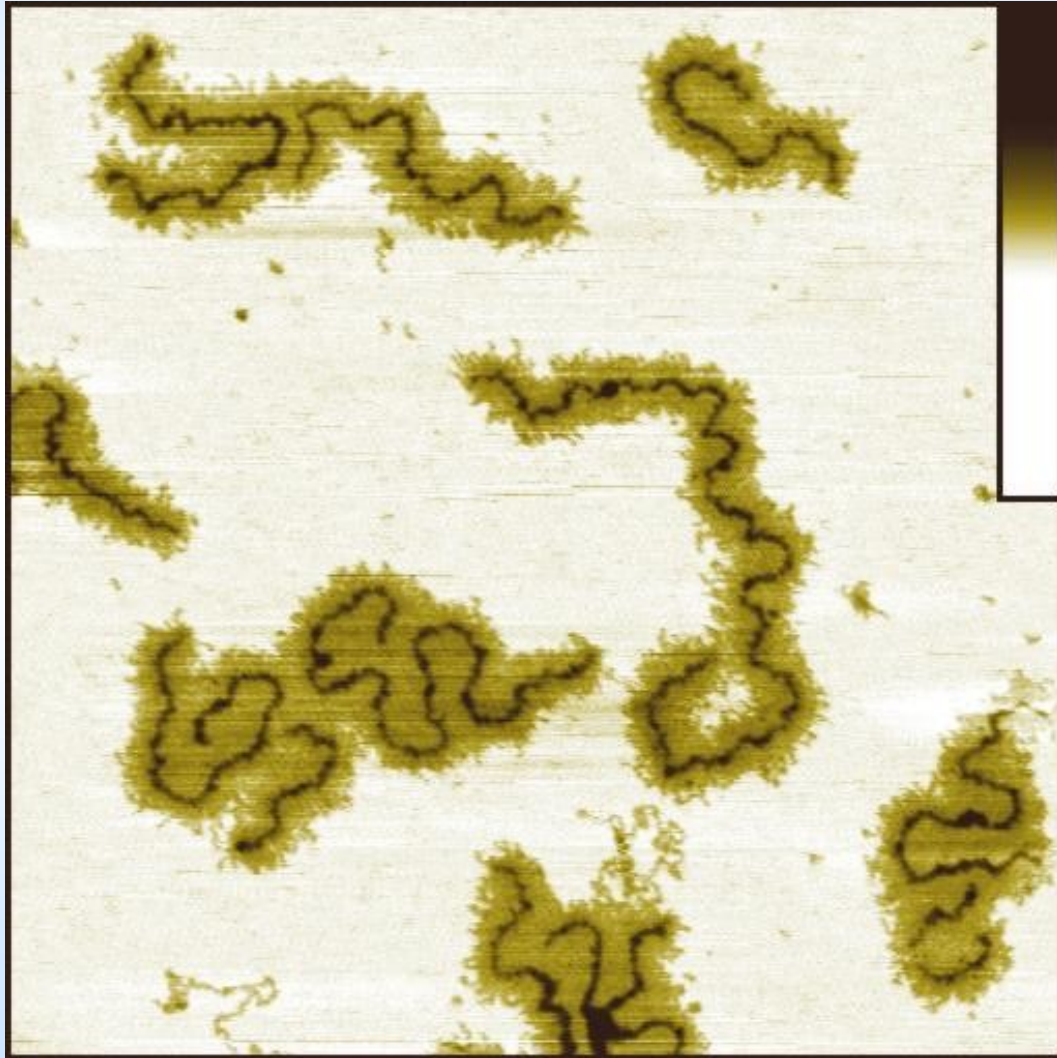


Иллюстрация возникновения искажений

Типичные изображения: цилиндрические полимерные щетки на слюде

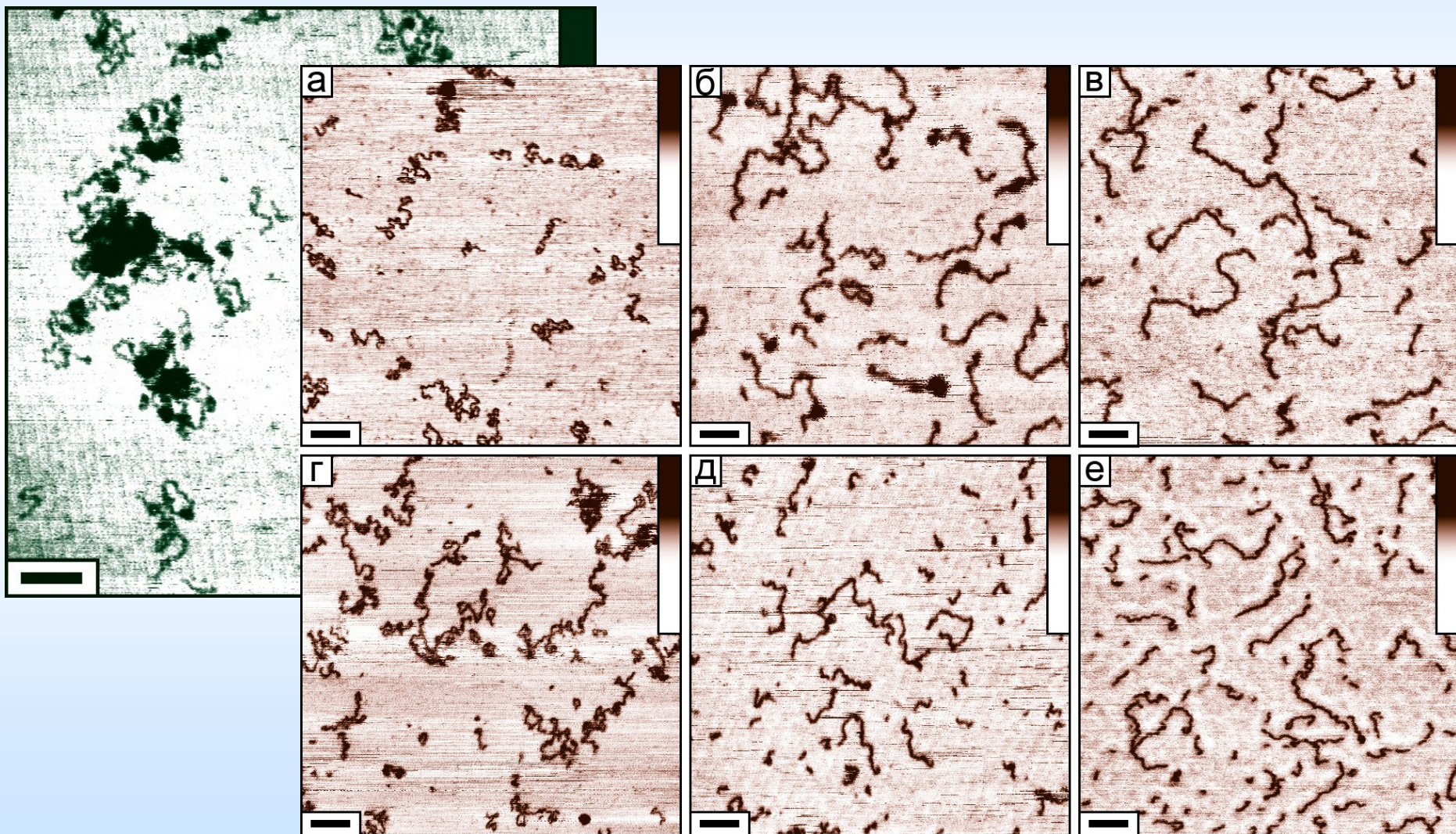


- Пришивка боковых цепей **н-БА** from ПБПЭМ макроинициатора согласно:
Beers K.L., et al.
Macromolecules **1998**, 31, 9413.
- Нанесение на вращающуюся **подложку** из раствора в хлороформе на слюду;
- **Изображение высокого разрешения:**
размер кадра: **750 750** нм,
шкала высот: **5** нм

План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - **Информативность ССМ**
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

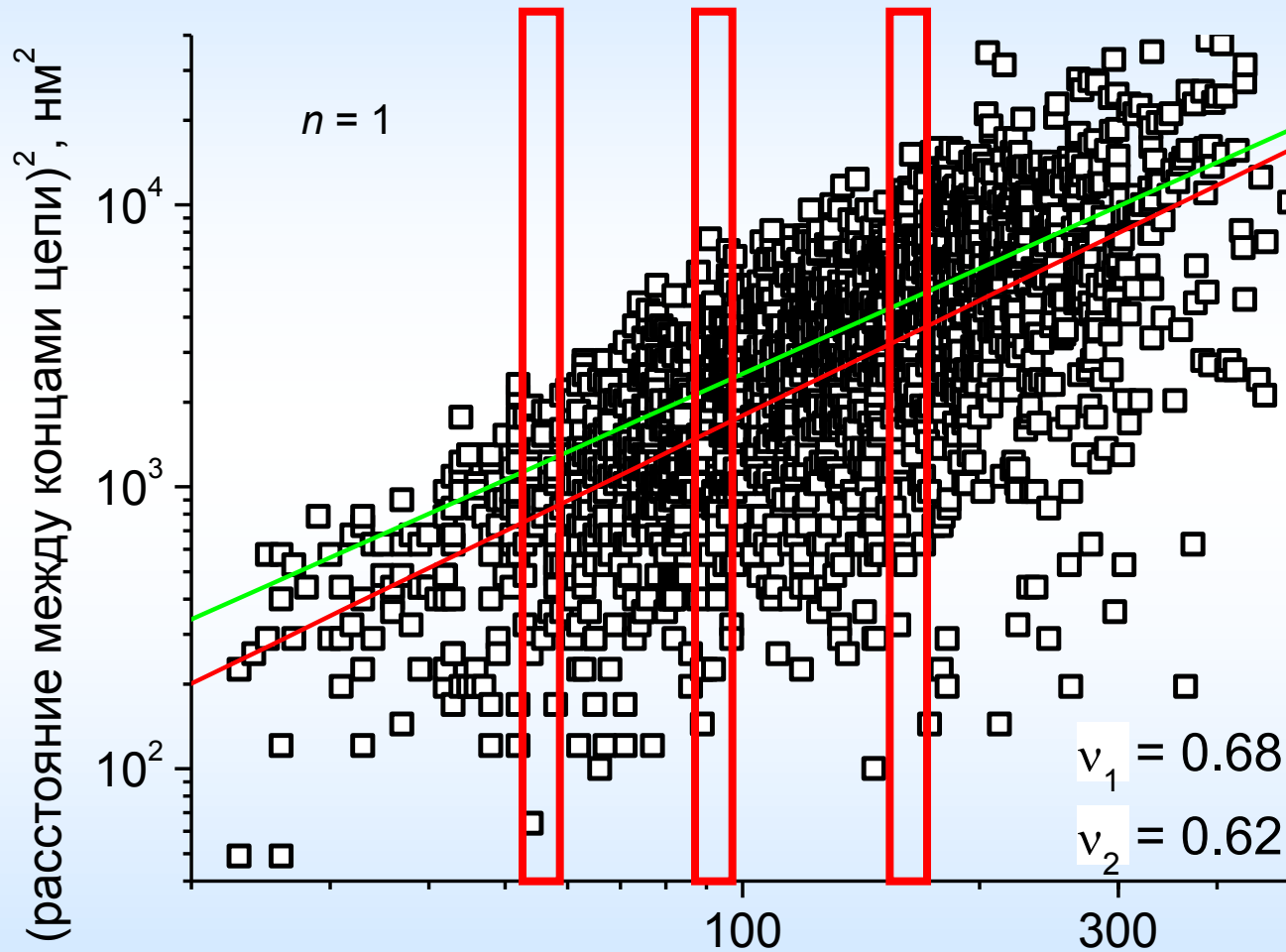
Модельная система: производные П4ВП на подложке



Показатель ν ($\langle R^2 \rangle = \text{const} \times L^{2\nu}$) -
индикатор статистики отдельных
макромолекул на подложке

Показатель ν	2D	3D
Идеальная цепь	1/2	1/2
Персистентные стержни	1	1
Самоизбегающие блуждания	3/4	$\sim 3/5$
θ -состояние	$\sim 4/7$	1/2
Компактная глобула	1/2	1/3

Определение ν ($\langle R^2 \rangle = \text{const} \times L^{2\nu}$) из массива измеренных размеров молекул

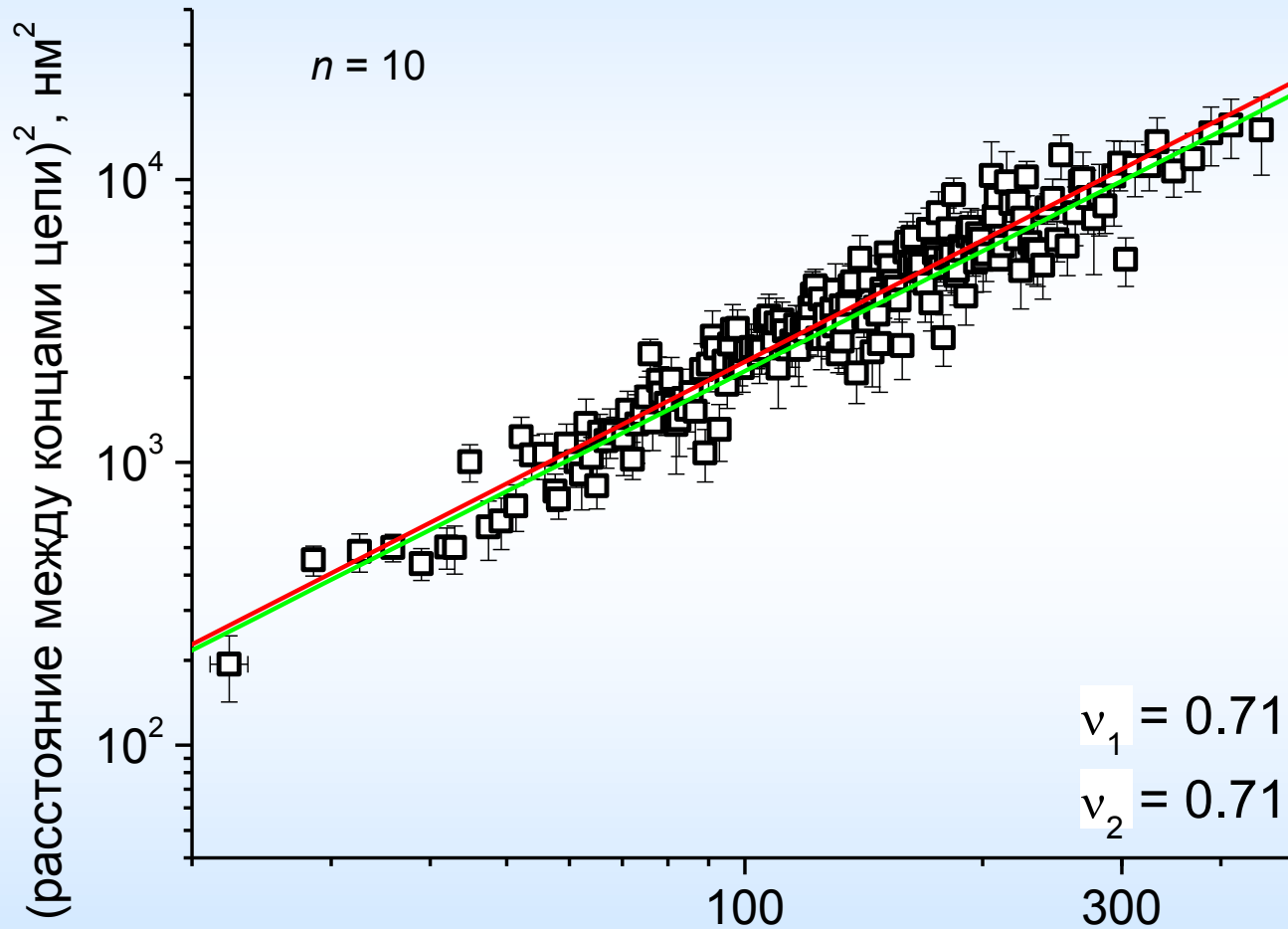


$N = 1800$

контурная длина, нм

Неусредненные точки

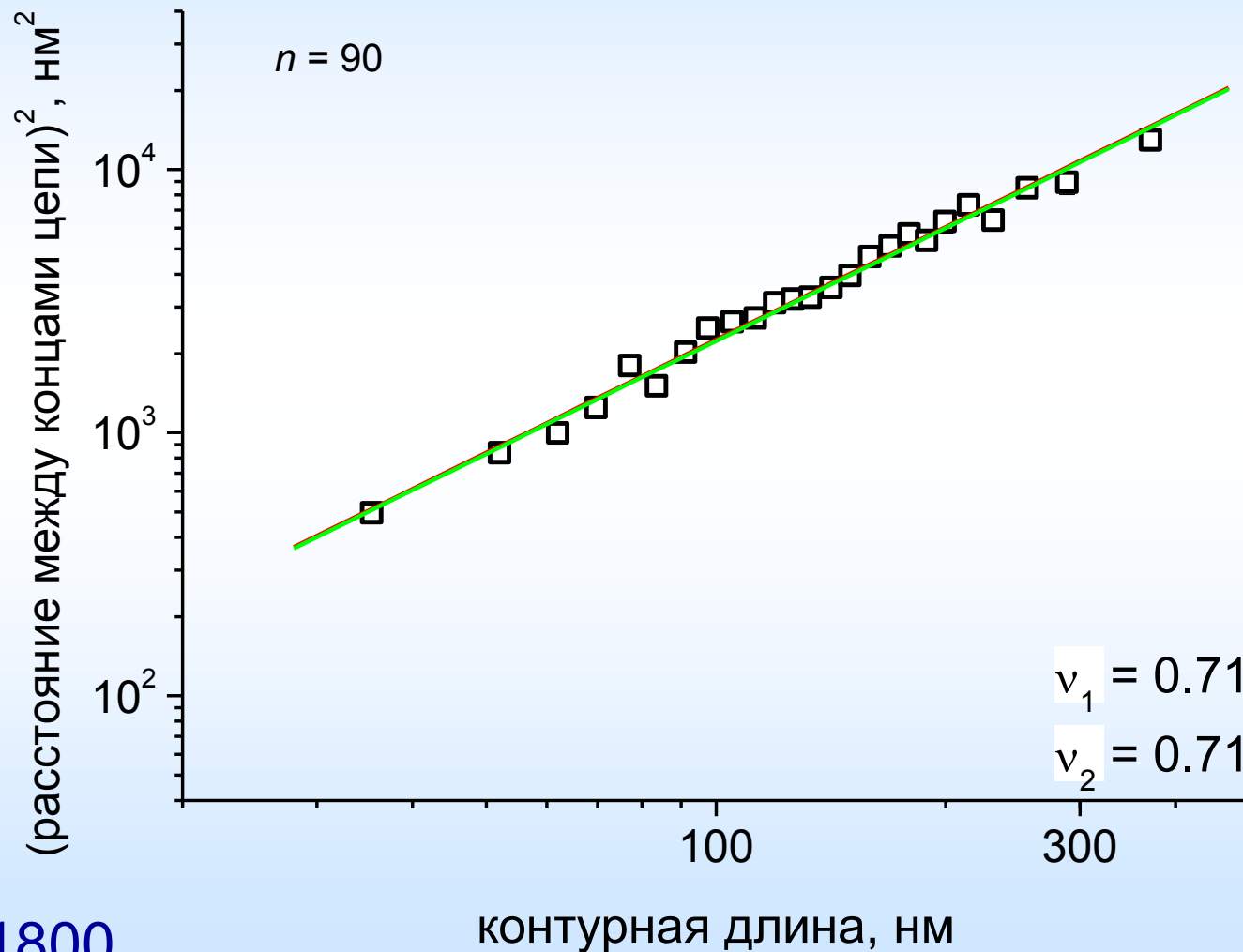
Определение ν ($\langle R^2 \rangle = \text{const} \times L^{2\nu}$) из массива измеренных размеров молекул



$N = 1800$

усреднение глубиной n

Определение ν ($\langle R^2 \rangle = \text{const} \times L^{2\nu}$) из массива измеренных размеров молекул



$N = 1800$

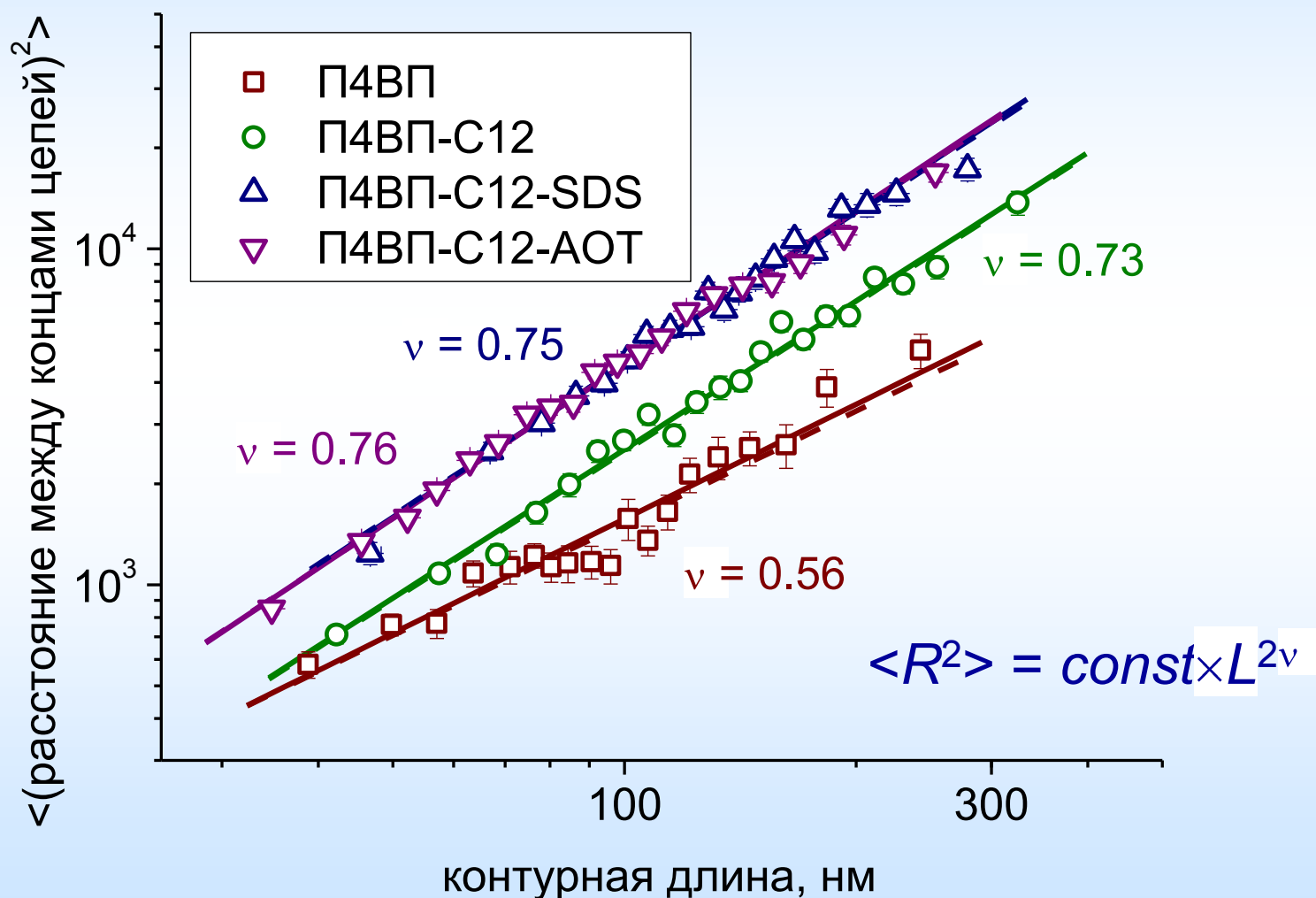
усреднение глубиной n

Поиск аппроксимации

- Процедура I
 - Линейная регрессия в двойном логарифмическом масштабе без учета погрешностей
- Процедура II
 - Взвешенная регрессия с частичным учетом погрешностей ($\langle R^2 \rangle_i$)
- Процедура III
 - Численная минимизация:

$$\chi^2(const, \nu) = \sum_{i=1}^{N/n} \left(\frac{\left(\widehat{R}_i^2 - const \times \widehat{L}_i^{2\nu} \right)^2}{\left(const \times 2\nu \widehat{L}_i^{2\nu-1} \Delta \widehat{L}_i \right)^2 + \left(\Delta \widehat{R}_i^2 \right)^2} \right)$$

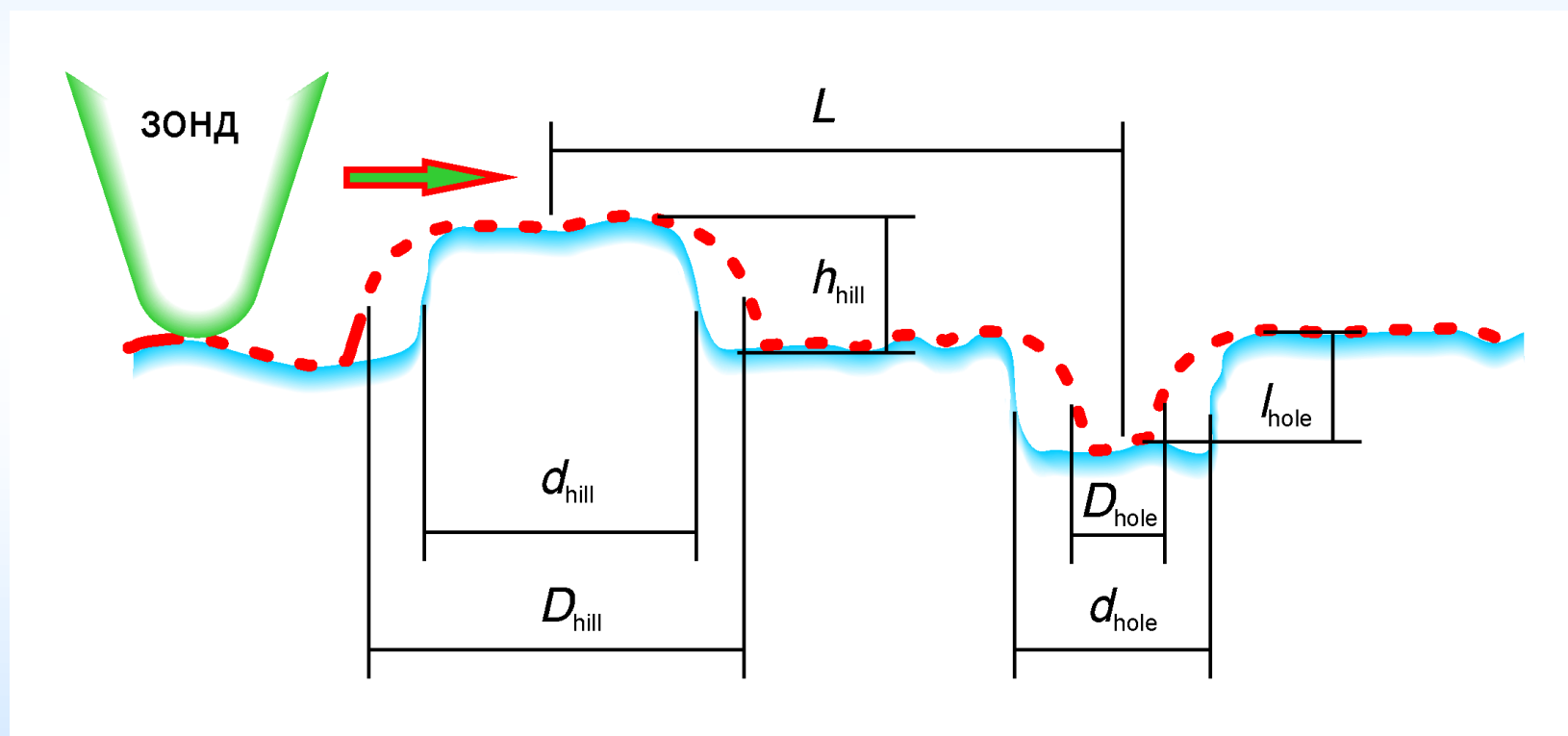
Корреляция линейных и среднеквадратичных латеральных размеров клубков



План доклада

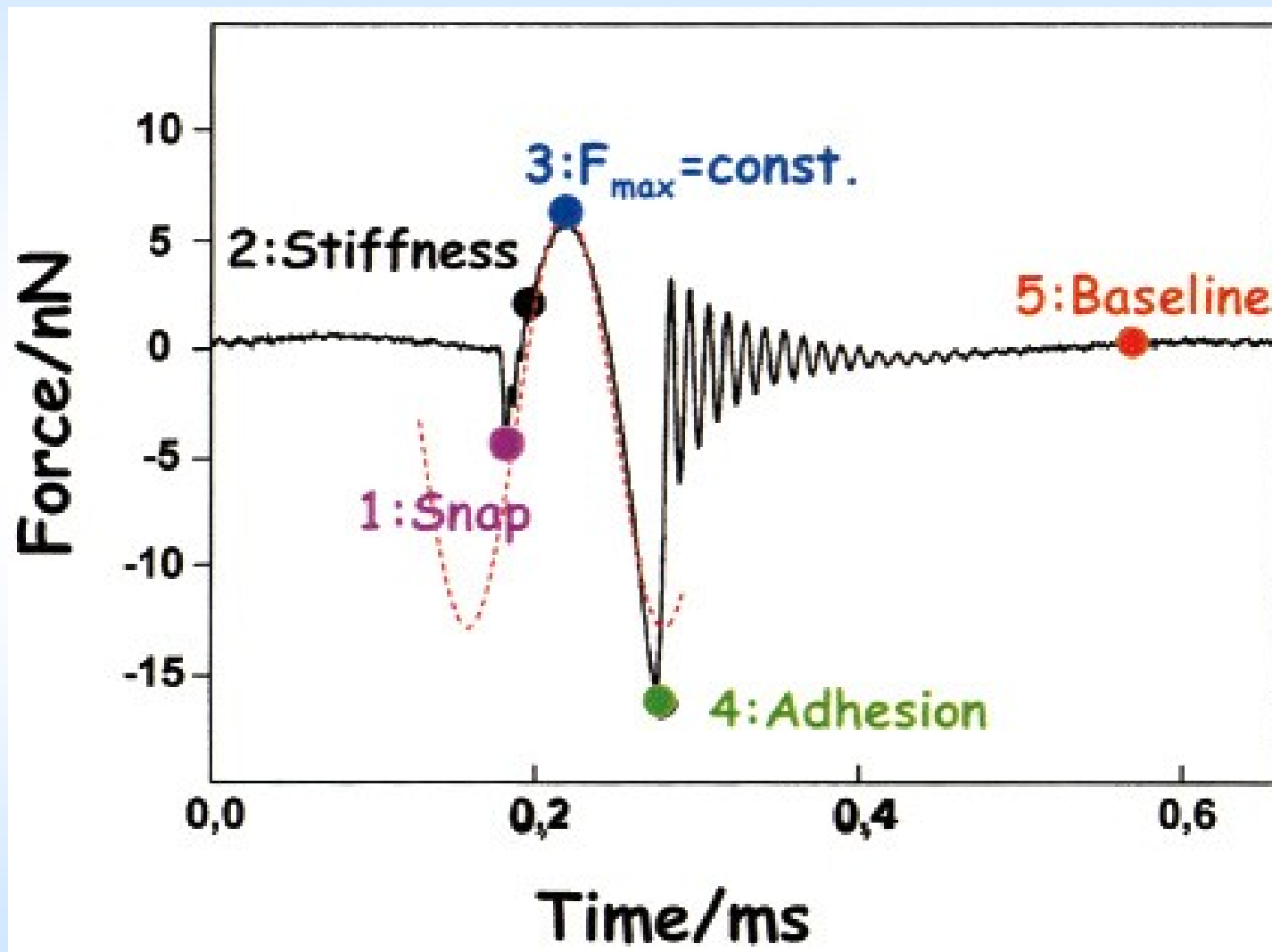
- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - **Дополнительные аналитические возможности ССМ**
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Область контакта зонда и образца изменяется при сканировании

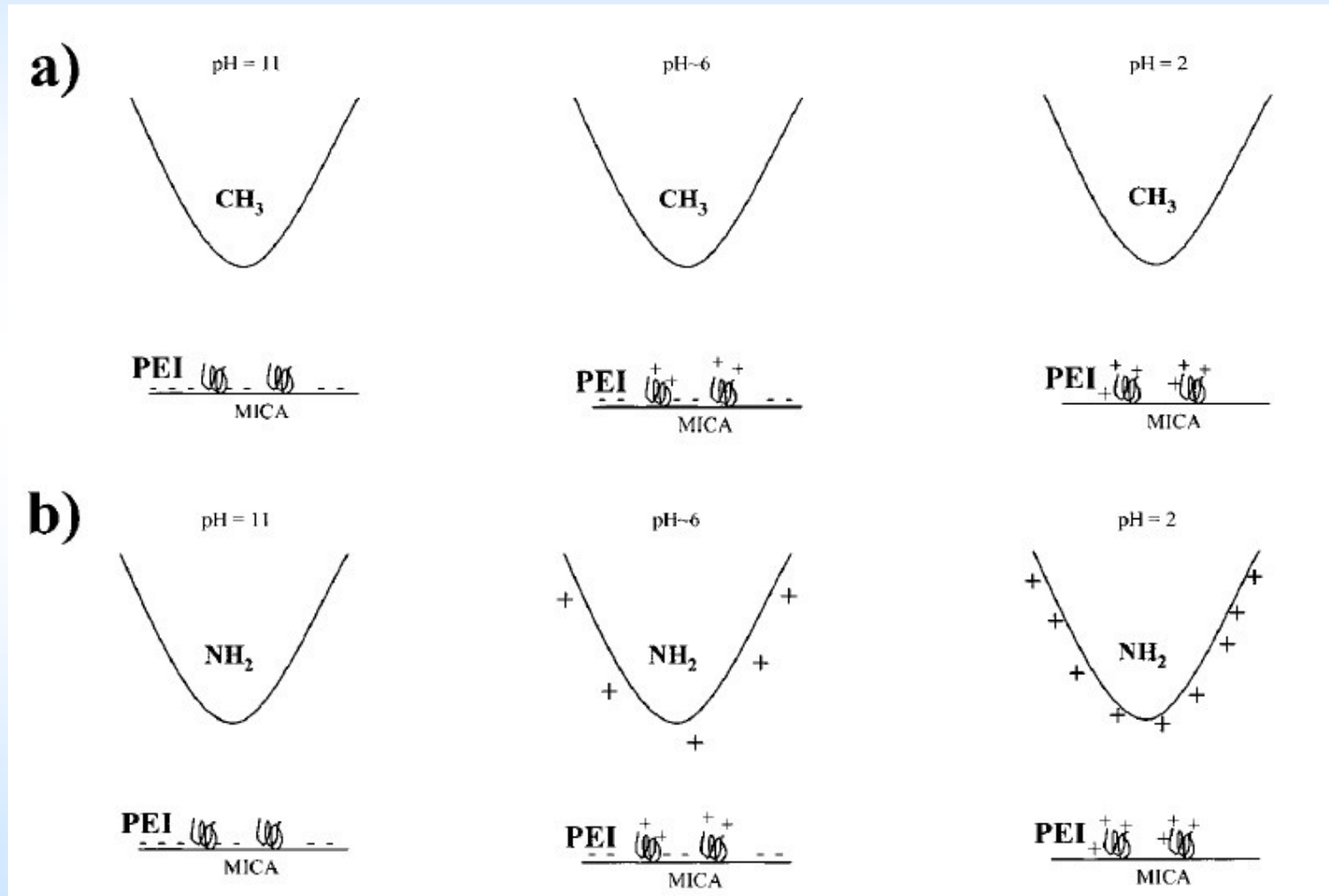


Принципиальное осложнение карты распределения анализируемых свойств поверхности

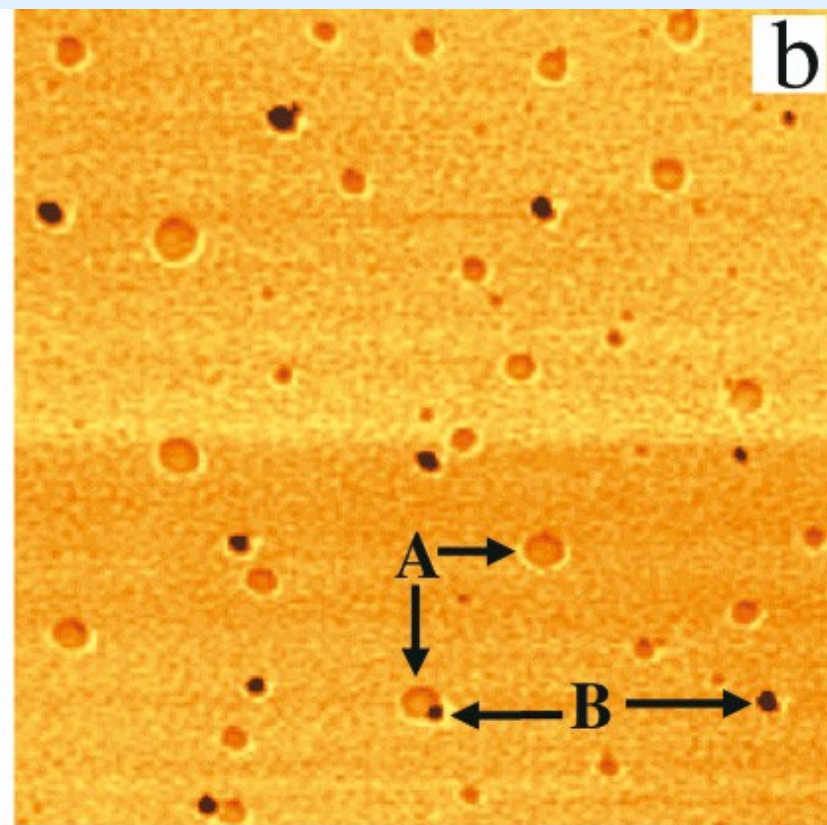
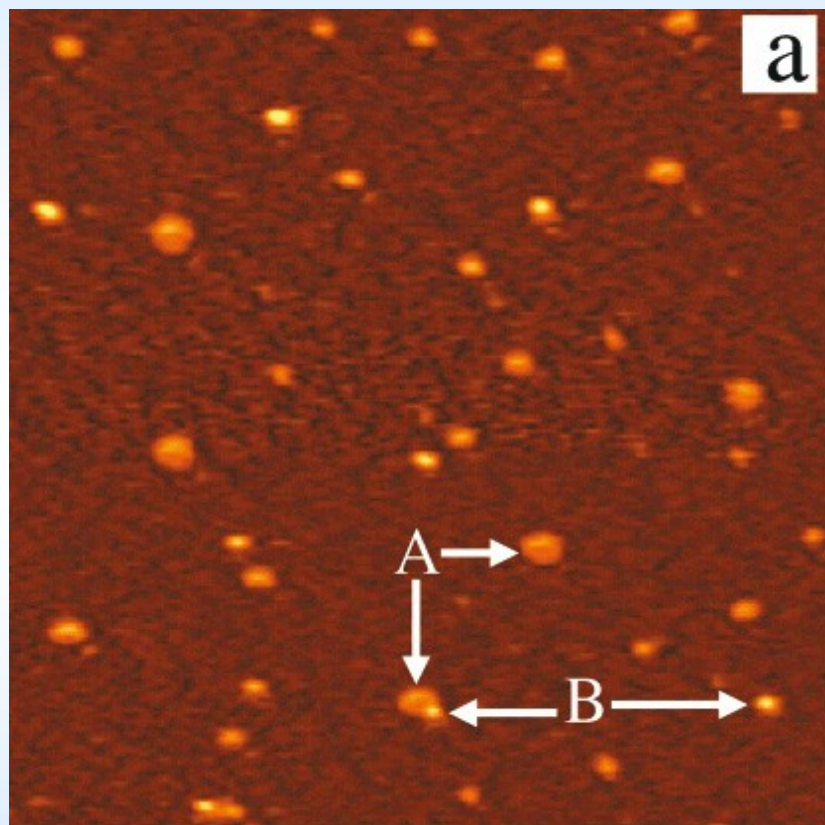
Принципы pulsed-force микроскопии



Химическая селективность в pulsed-force микроскопии



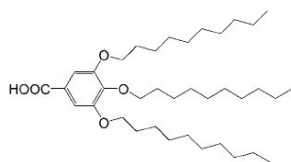
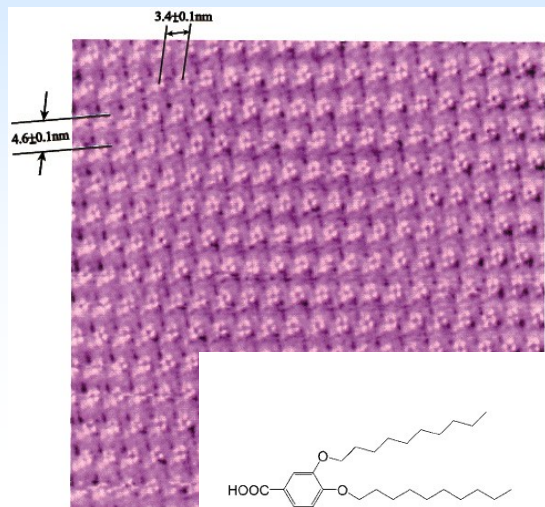
Химическая селективность в pulsed-force микроскопии



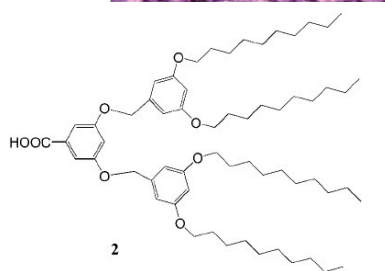
План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - **Сопоставление ССМ и СТМ**
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

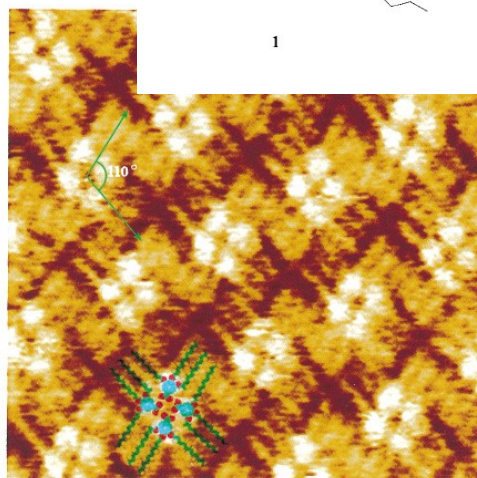
СТМ органических монослоев



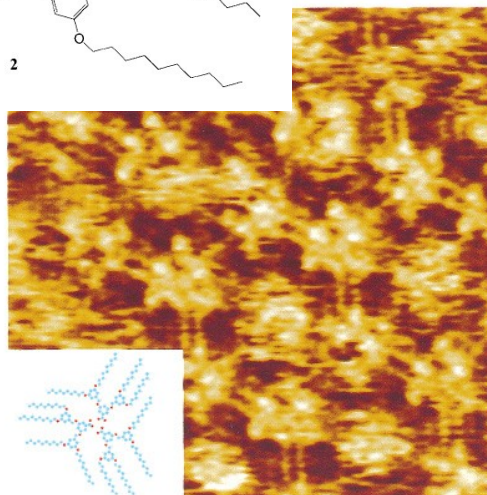
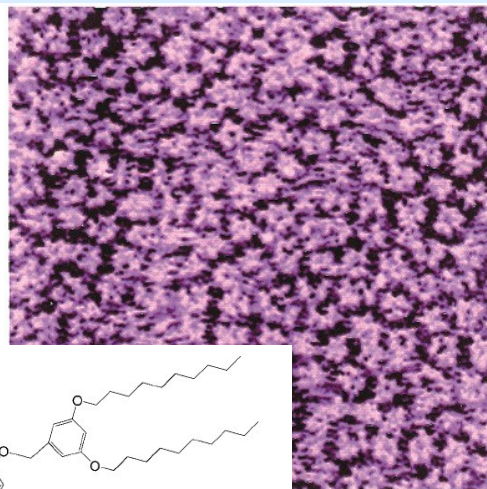
1



2



b



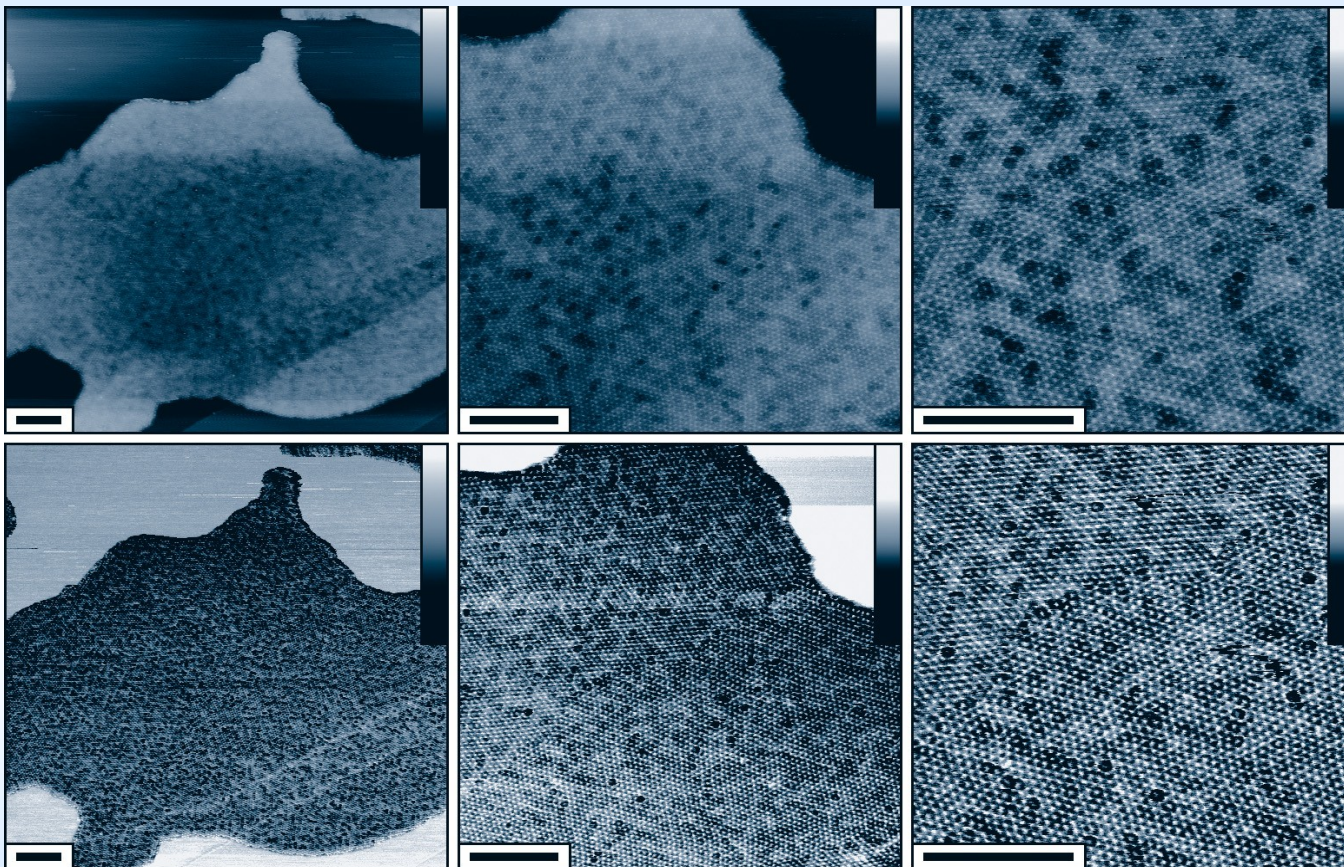
b

Высокое разрешение при визуализации как регулярных двумерных решеток, так и разупорядоченных монослоев адсорбированных органических молекул.

Размер кадра:

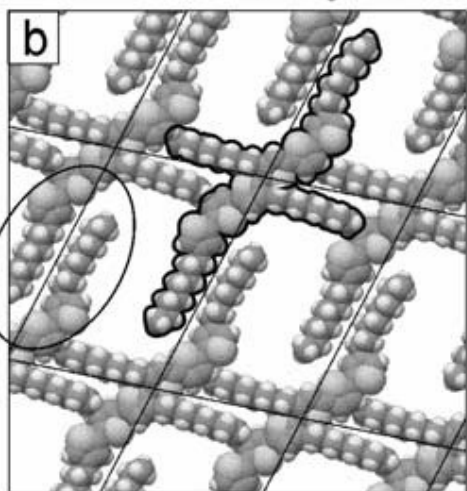
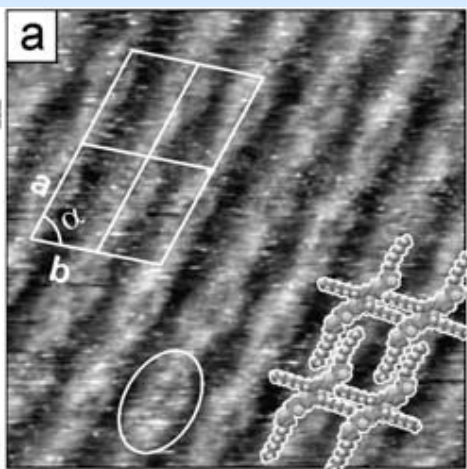
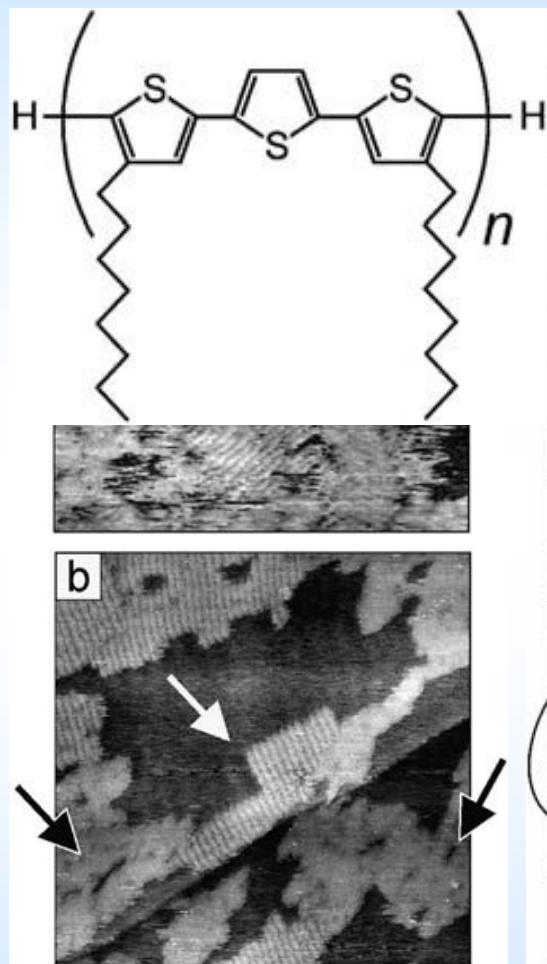
$15 \times 15 \text{ nm}$ (слева),
 $18 \times 18 \text{ nm}$ (справа)

ССМ: Молекулярная упаковка дендримеров



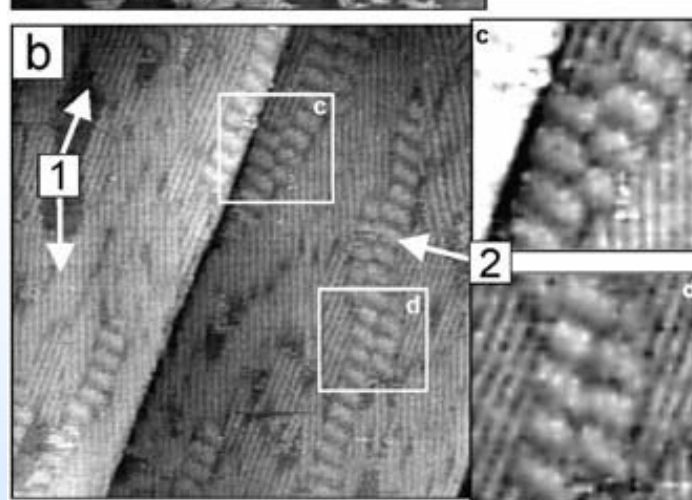
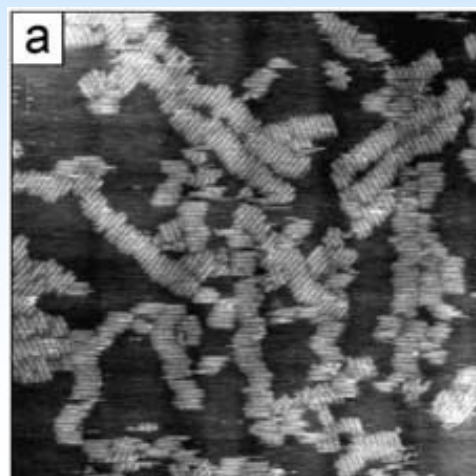
Фторуглеводородные дендримеры (синтезированы в группе члена-корреспондента РАН, проф. А.М. Музафарова), **осаждение из ГФБ**, реперная черта 100 нм

СТМ макромолекул политиофенов



(a) 77 × 77 нм
(b) 107 × 107 нм

(a) 10 × 10 нм

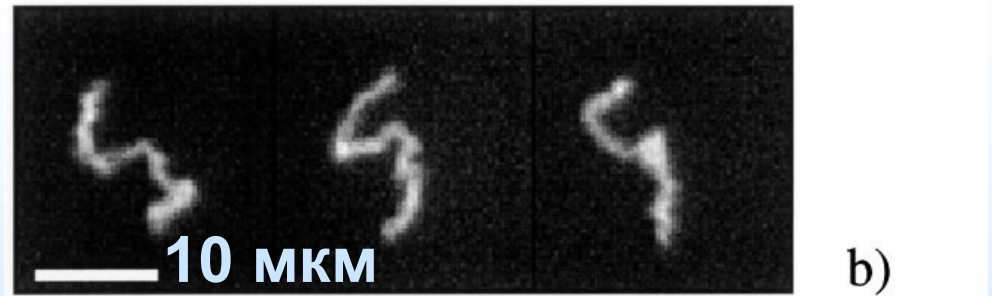
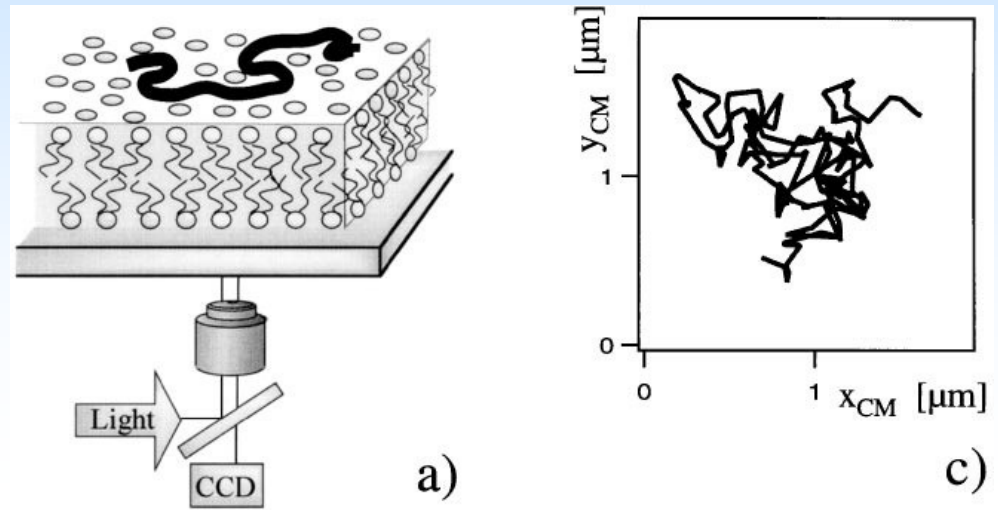
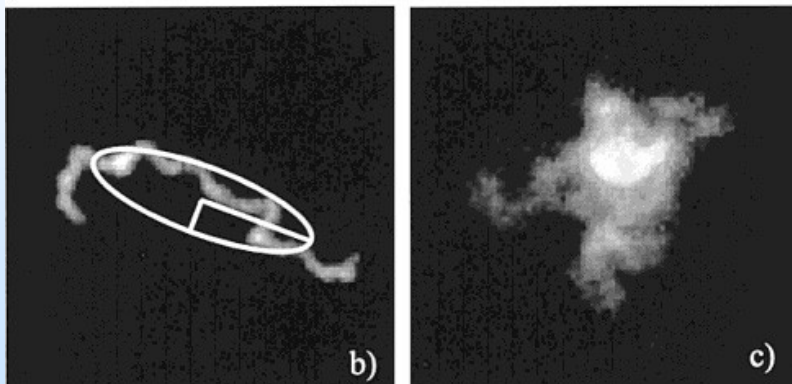
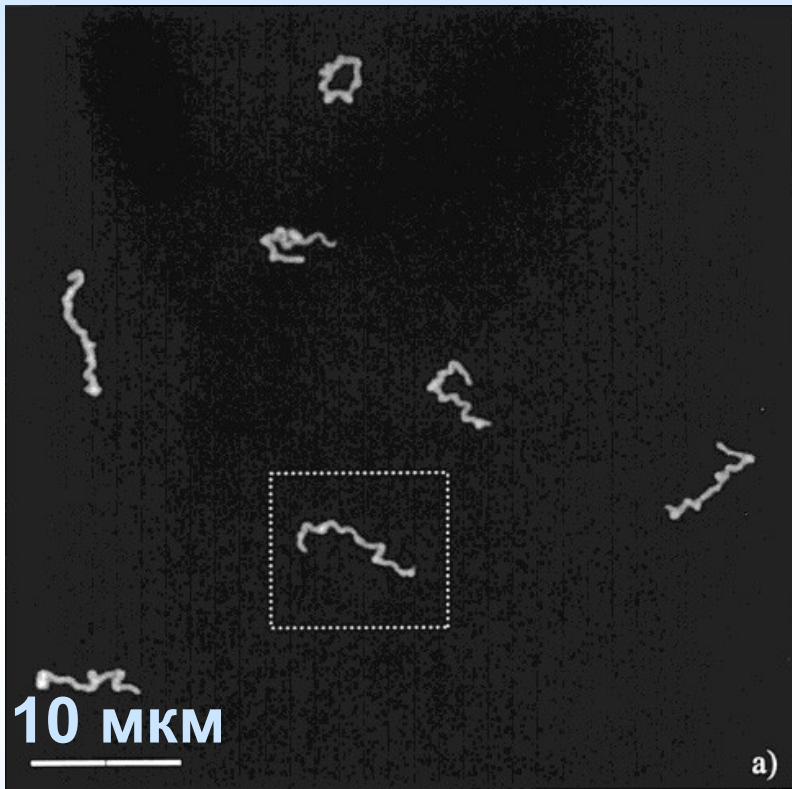


(a) 92 × 92 нм
(b) 122 × 122 нм

План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- **Методы оптической микроскопии**
 - **Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия**
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Изображения ФМ макромолекул ДНК



Флуоресцентная микроскопия
макромолекул ДНК, конформационный
анализ двумерных цепей

Принцип лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

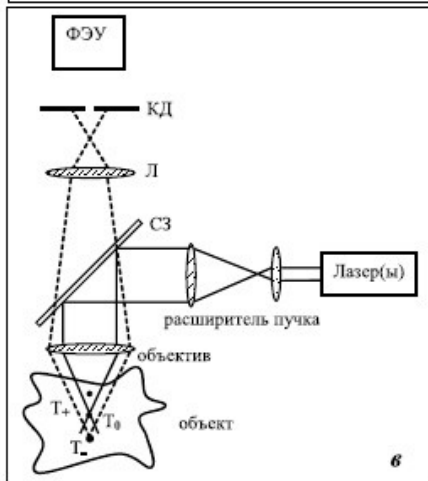
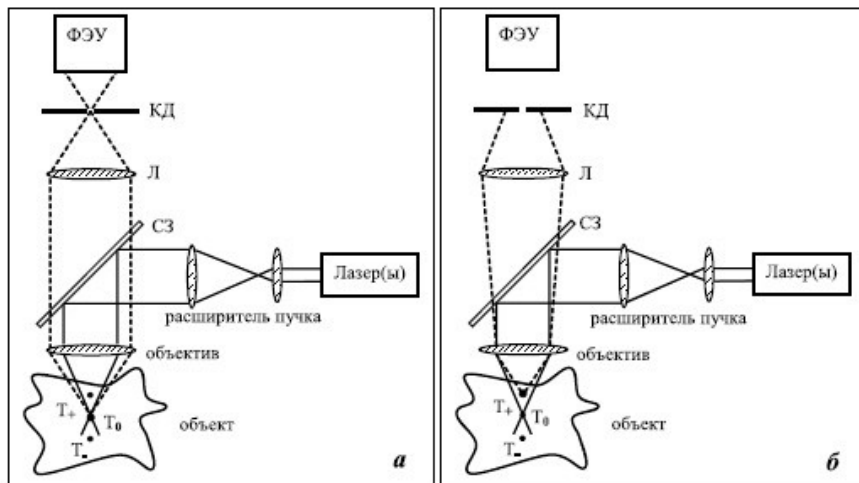
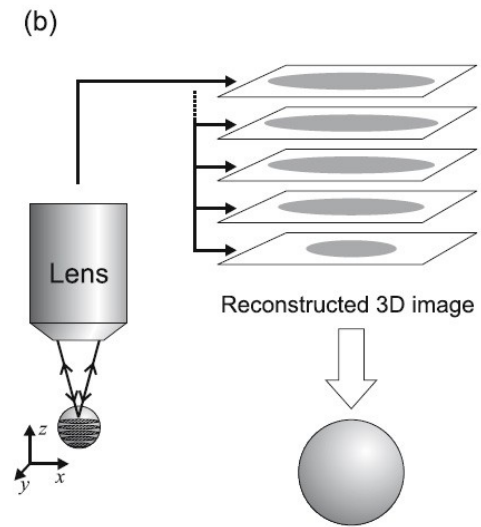
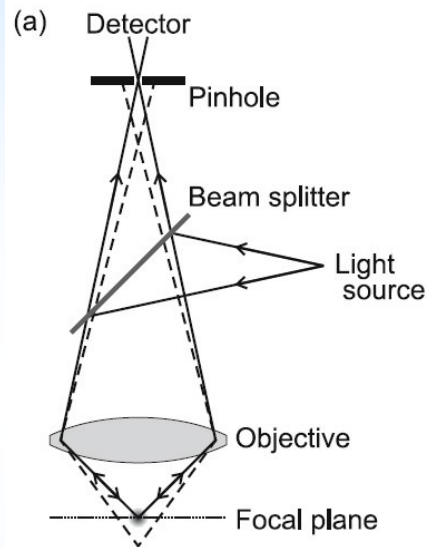


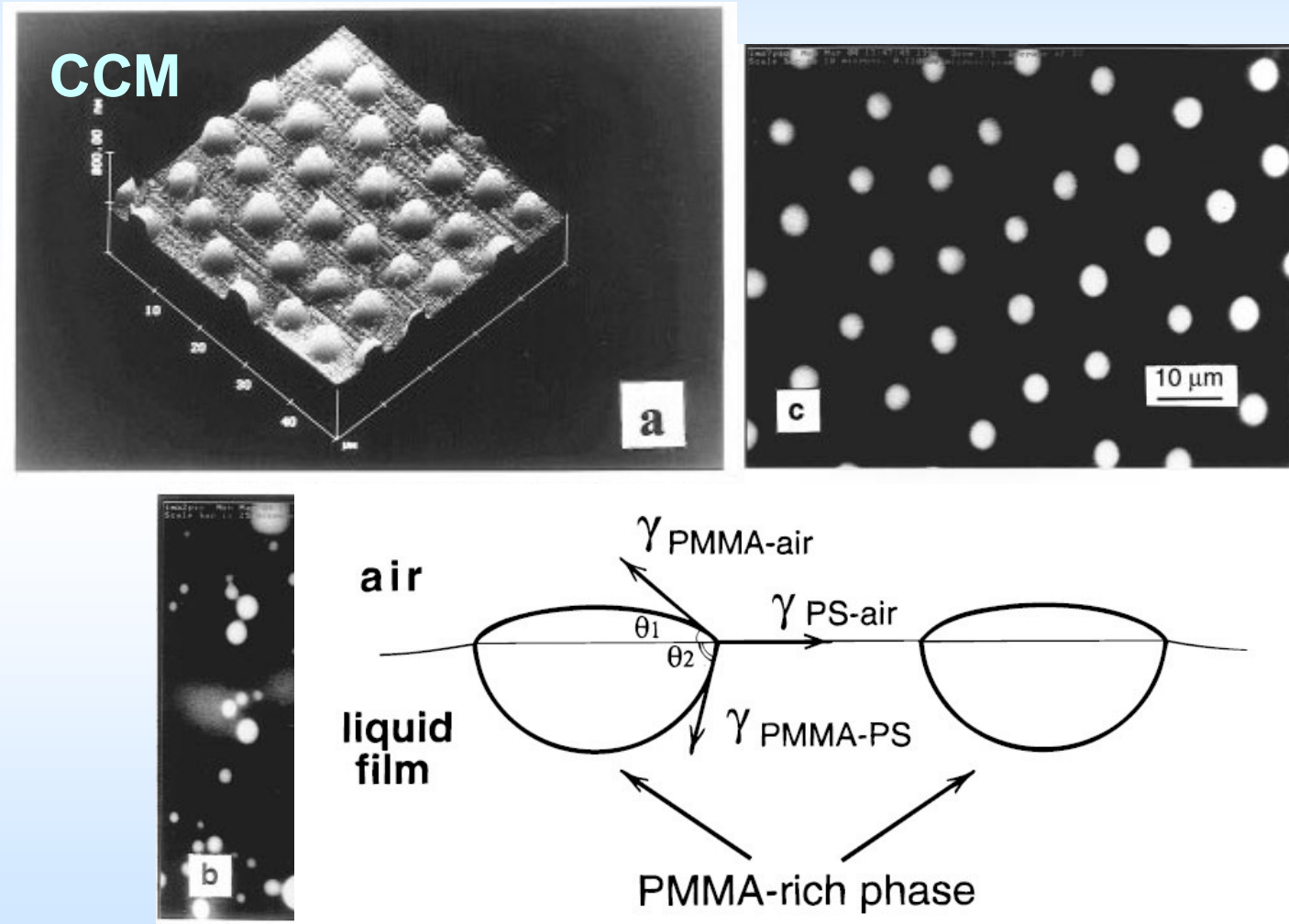
Рис. 1. Принцип конфокальной фильтрации сигнала.

Луч лазера (непрерывная линия) с помощью селективного зеркала (СЗ) направляется в объектив микроскопа и фокусируется в точку T_0 в глубине исследуемого объекта. Флуоресценция, излучаемая из этой точки (прерывистая линия), собирается объективом и фокусируется линзой Л в сопряженной фокальной плоскости объектива, проходя через отверстие в конфокальной диафрагме (КД) к фотозлектронному умножителю (ФЭУ) (а). Флуоресценция, излучаемая из точек T_+ (б) и T_- (в), дефокусируется на КД и к ФЭУ не проникает. Таким образом обеспечивается подавление флуоресценции, испускаемой из точек образца, расположенных выше и ниже фокуса объектива, и улучшается разрешение вдоль оптической оси объектива.



Конфокальная диафрагма для пространственной селекции сигнала флуоресцентного отклика, сканирование, информация о трехмерной структуре

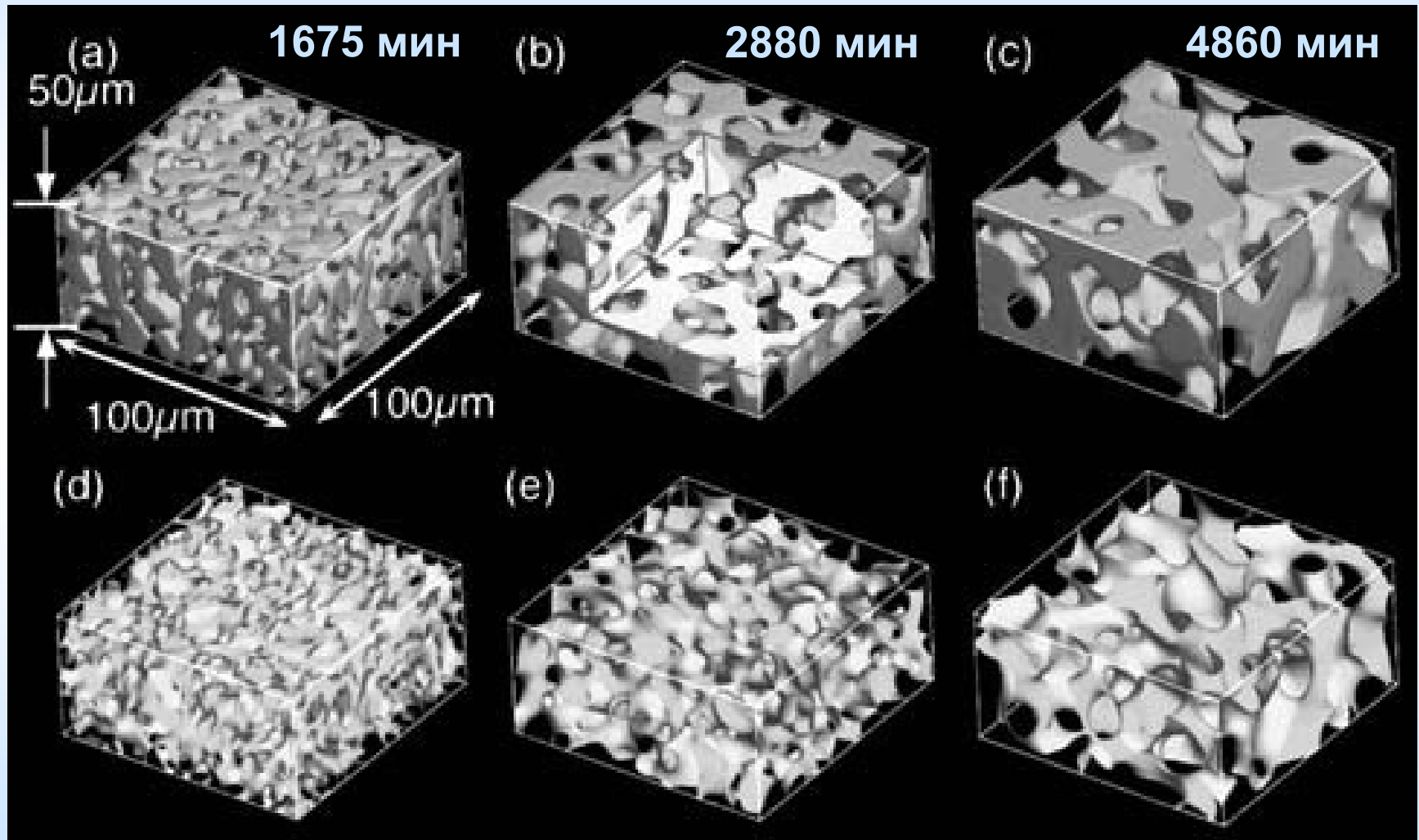
Фазовое разделение в смесях ПС / ПММА: результаты ЛСКМ



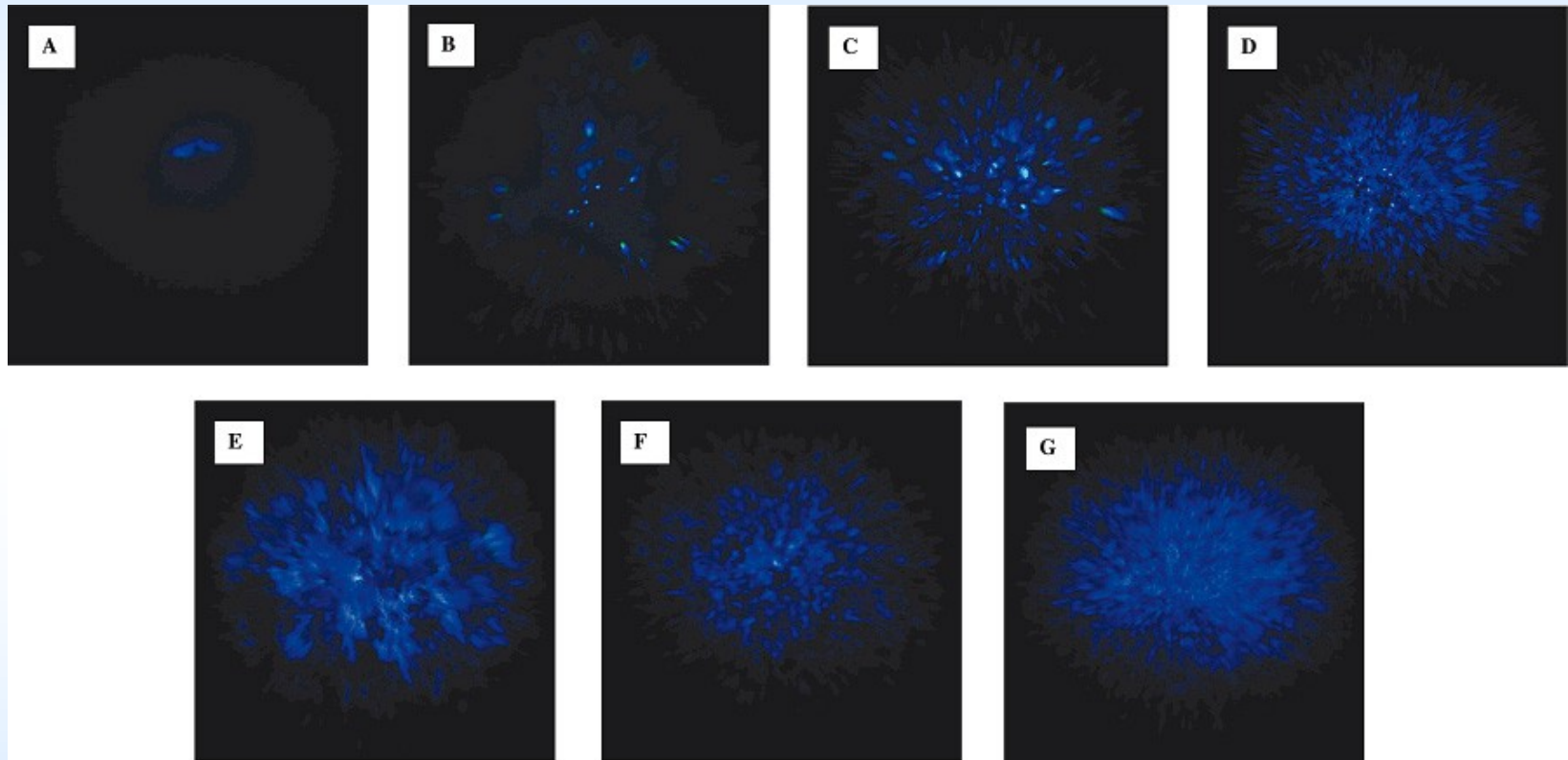
План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (SSM)
 - Погрешности визуализации в SSM
 - Информативность SSM
 - Дополнительные аналитические возможности SSM
 - Сопоставление SSM и STM
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление SSM с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами SSM
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость SSM
 - Исследование динамики процессов на подложке

ЛСКФМ: динамика фазового разделения в смесях полимеров



Агрегация молекул β -глюкана в растворе: наблюдения ЛСКМ

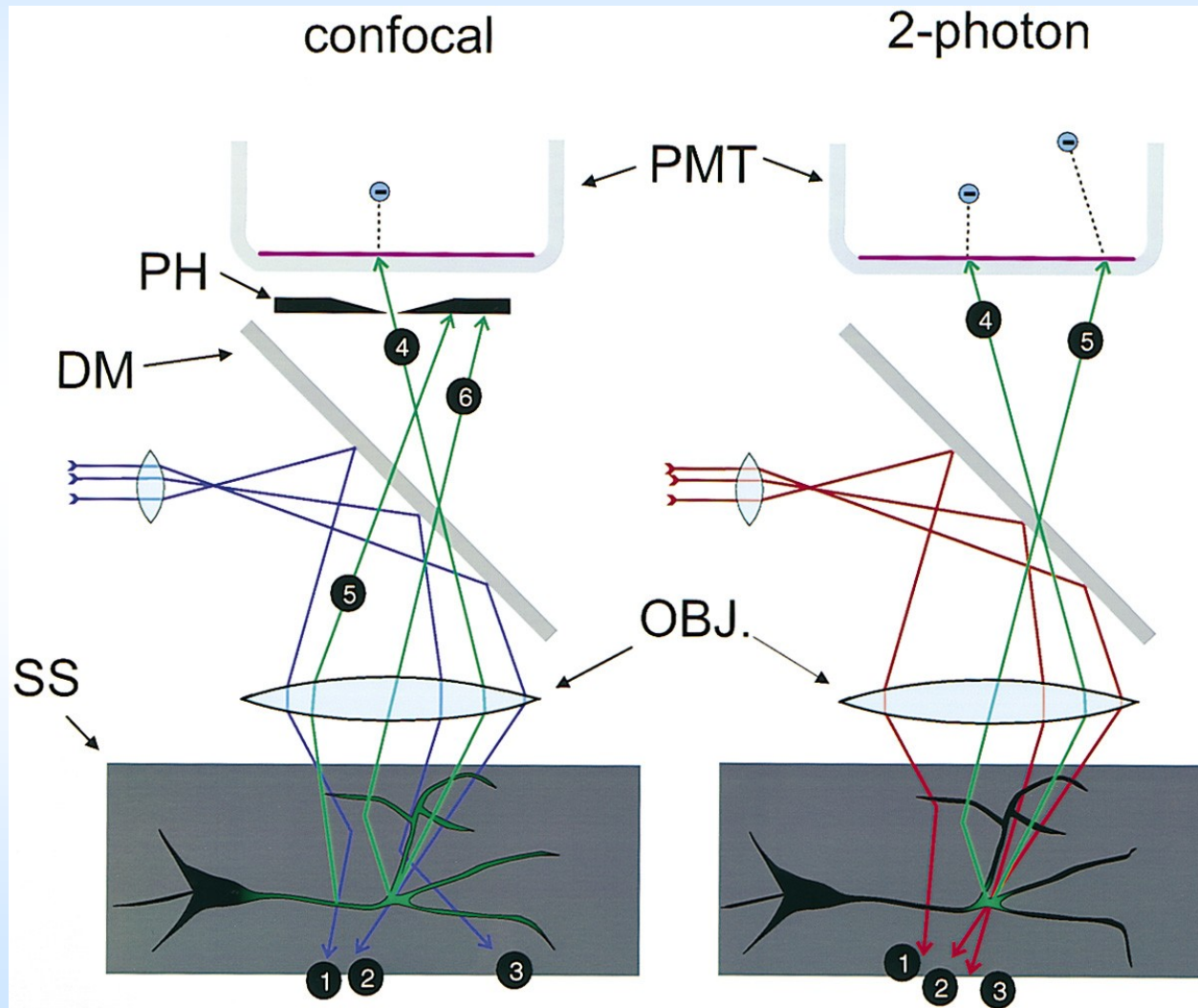


Возрастание концентрации в ряду: (A) 5, (B) 10, (C) 15, (D) 40, (E) 60, (F) 80, и (G) 100 мг/мл. Размер кадра 300 мкм $\times$ 300 мкм

План доклада

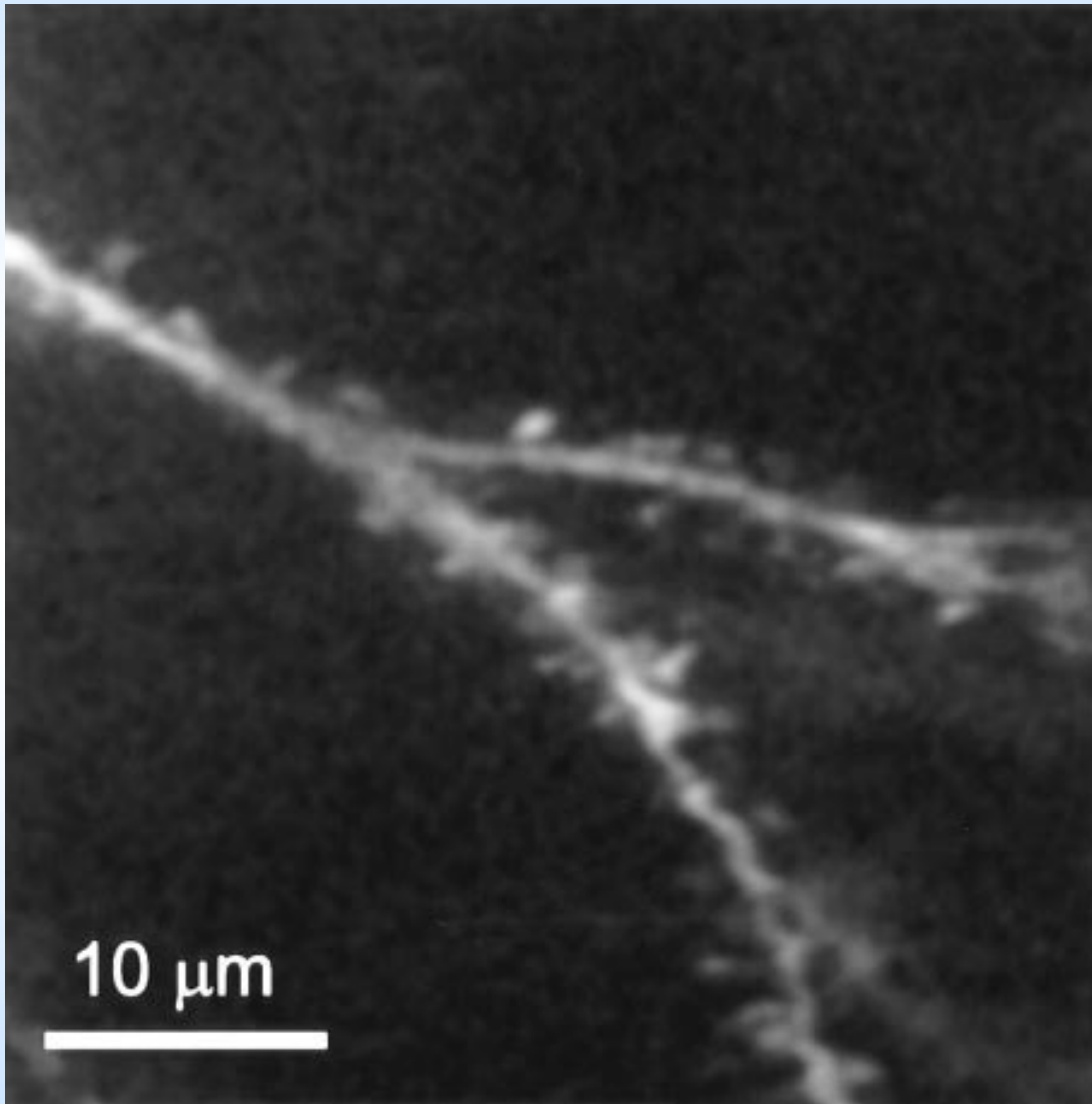
- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - **Преимущества многофотонной схемы**
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Преимущества многофотонной схемы ЛСКМ



Сочетание высокого разрешения и высокой интенсивности сигнала (нет необходимости в диафрагме), предотвращение обесцвечивания красителя (возбуждение на иной длине волны), меньше рассеяние (больше контраст)

Изображение многофотонной ЛСКФМ

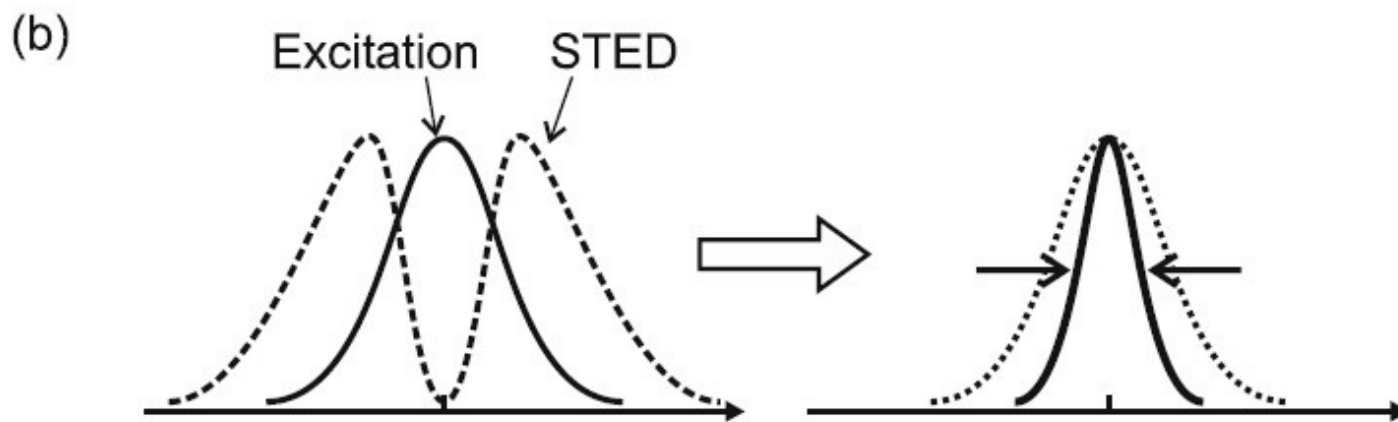
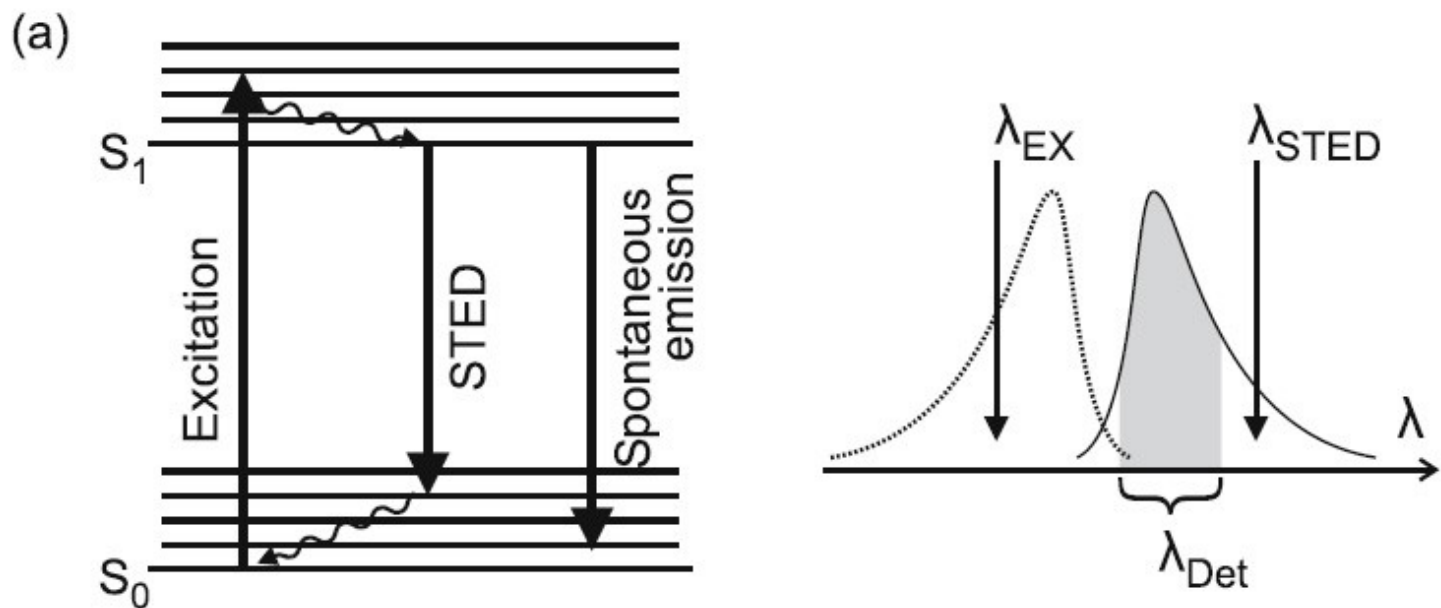


Изображение
нейрона *in vivo*,
высокое
разрешение

План доклада

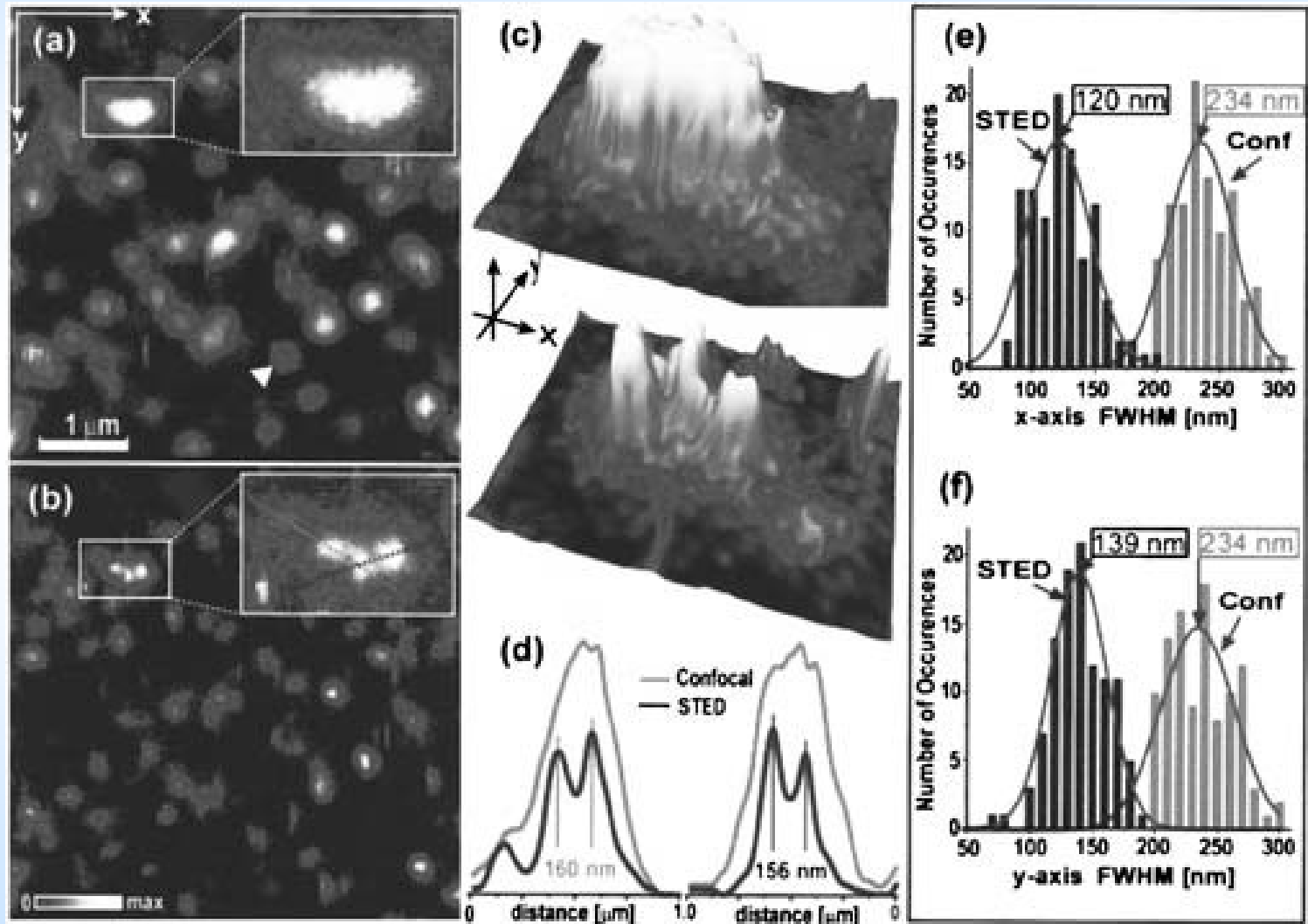
- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - **STED микроскопия**
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Принципы STED-микроскопии

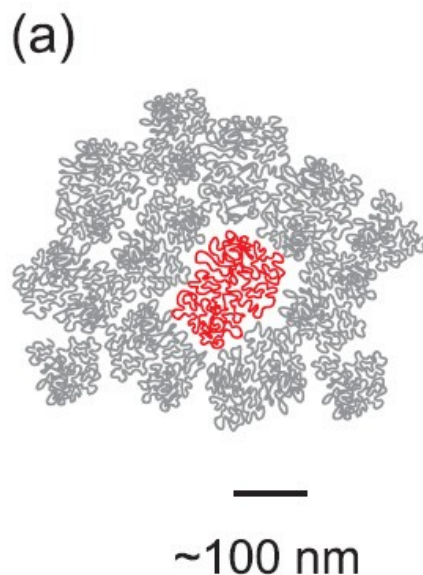
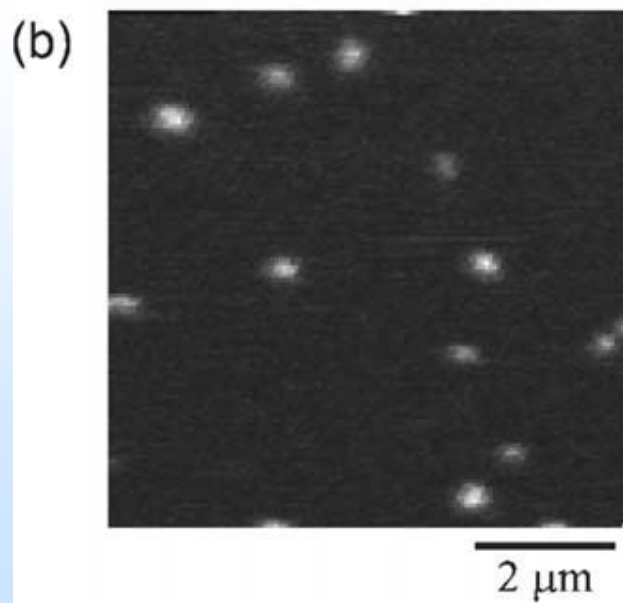
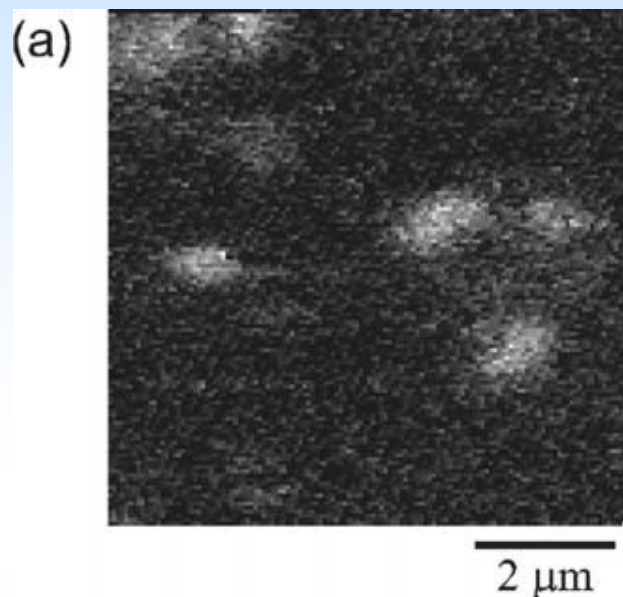


STED-микроскопия преодолела оптический предел разрешения

Молекулы флуоресцентного красителя



СМБП одиночных макромолекул

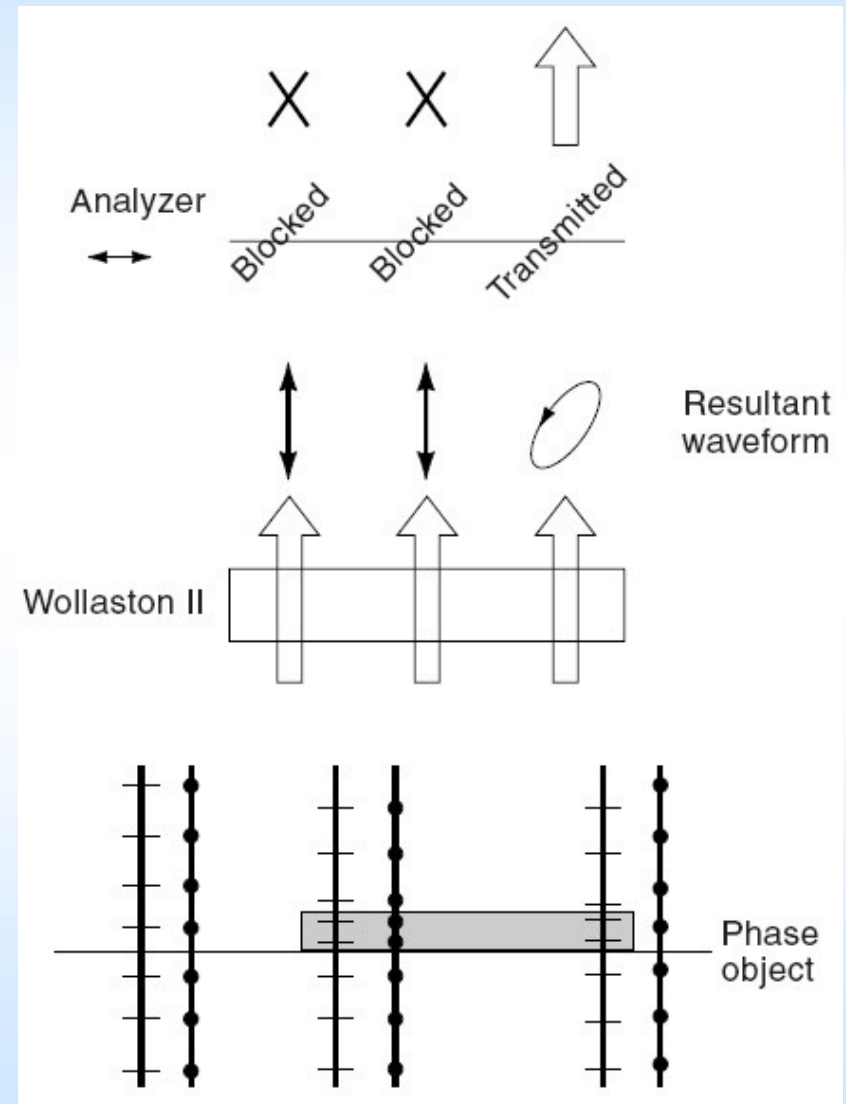
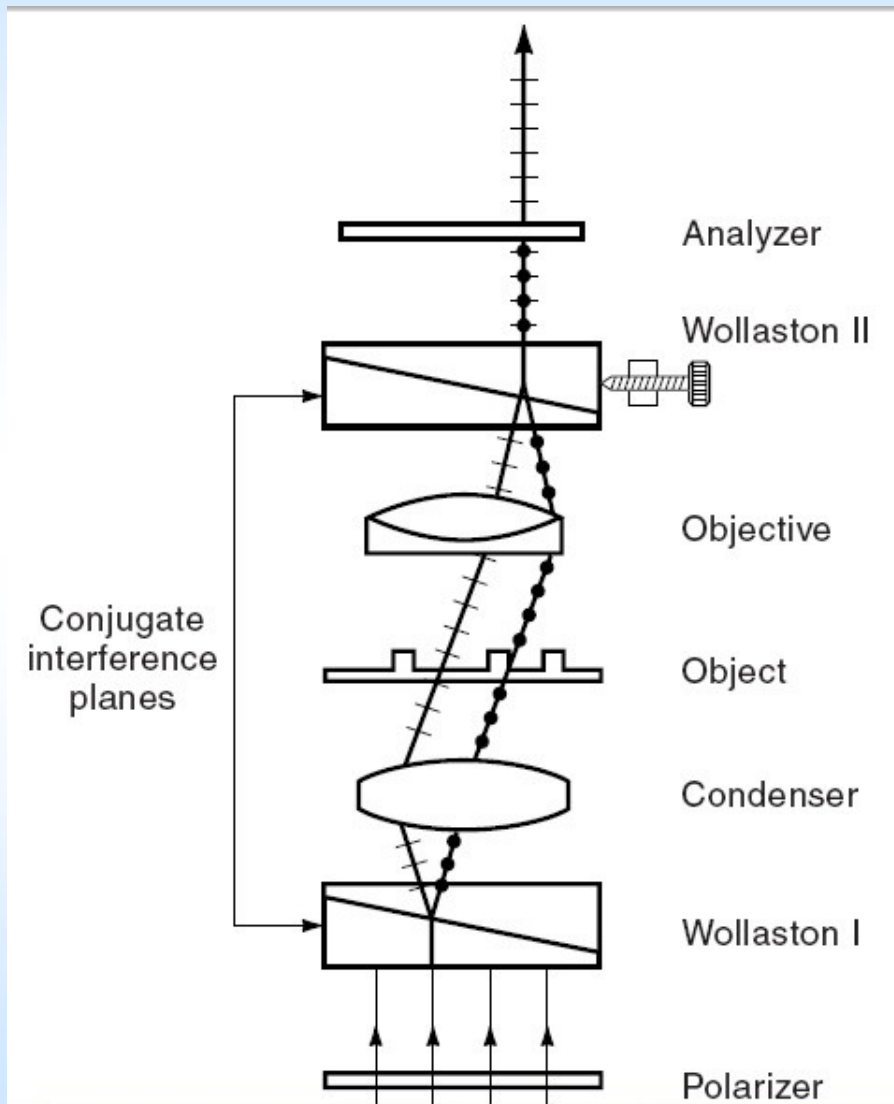


Сканирующая микроскопия ближнего поля
одиночных «прокрашенных»
(флуоресцирующих) макромолекул
полиизобутилметакрилата в полимерной
матрице из низкомолекулярных и
высокомолекулярных цепей той же природы

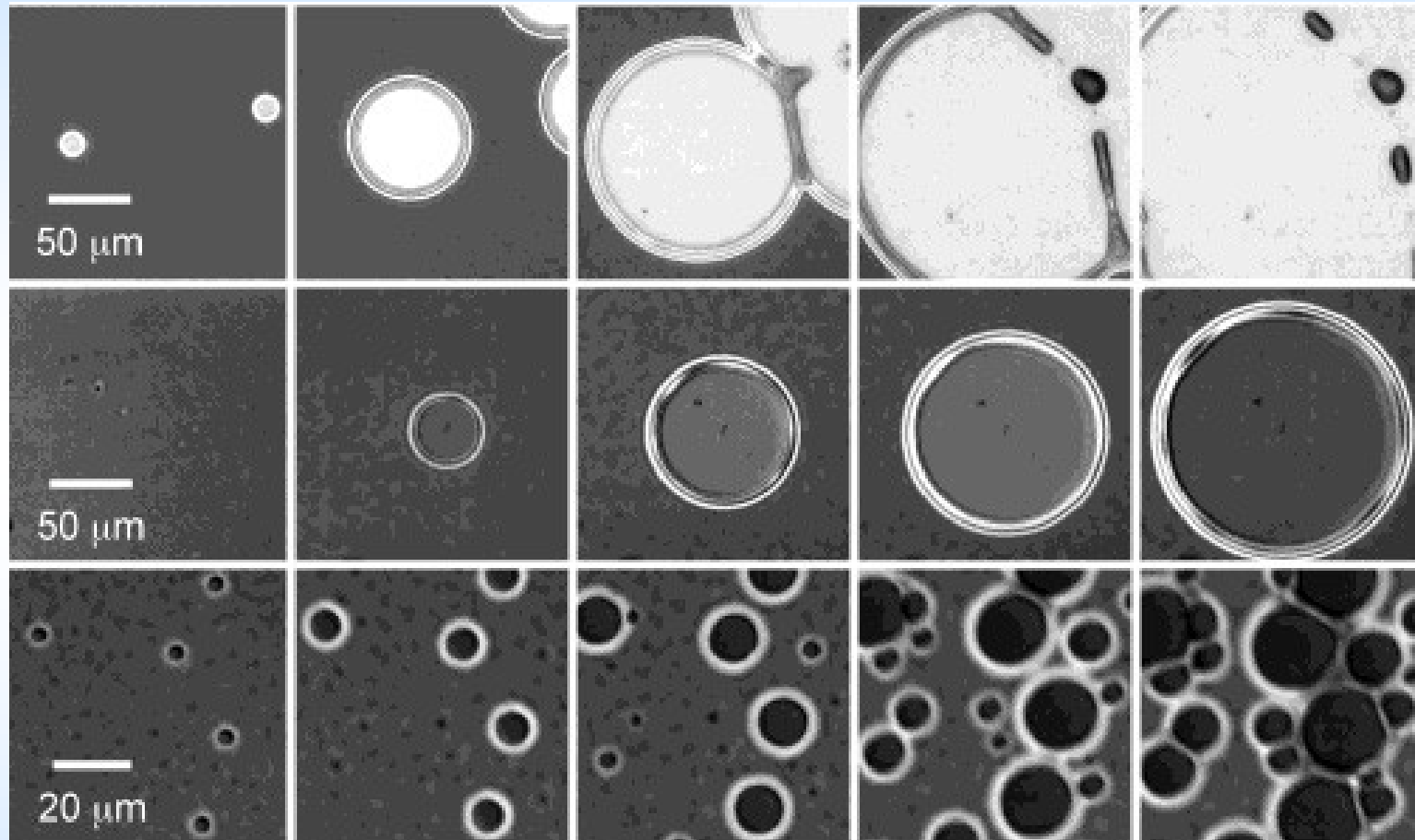
План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Принципы ДИК микроскопии



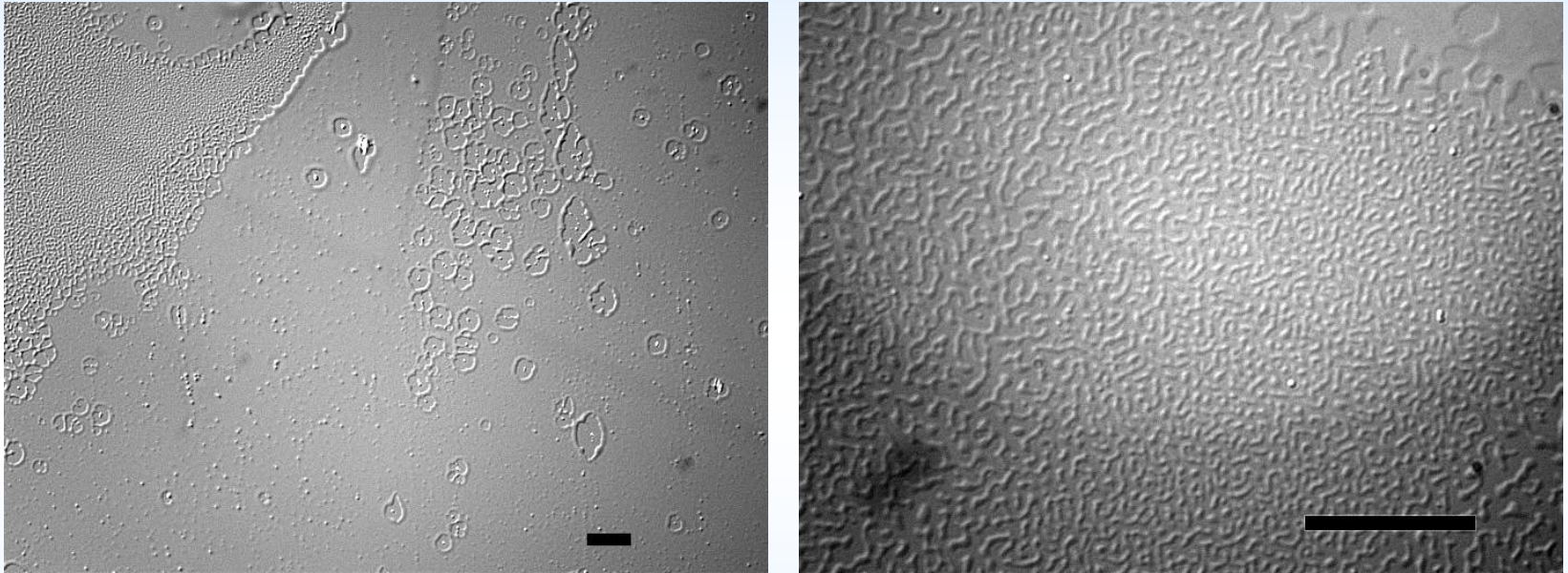
ДИК: Потеря смачиваемости (dewetting) подложки полимерной пленкой



ДИК микроскопия: Динамика потери смачиваемости стеклянной подложки смешанной пленкой ПС/ПММА в присутствии наногелевых частиц при отжиге. **Толщина** полимерной пленки **50-60 нм**.

Wei et al. // Macromolecules **2004**, 37(21), 7857-7860

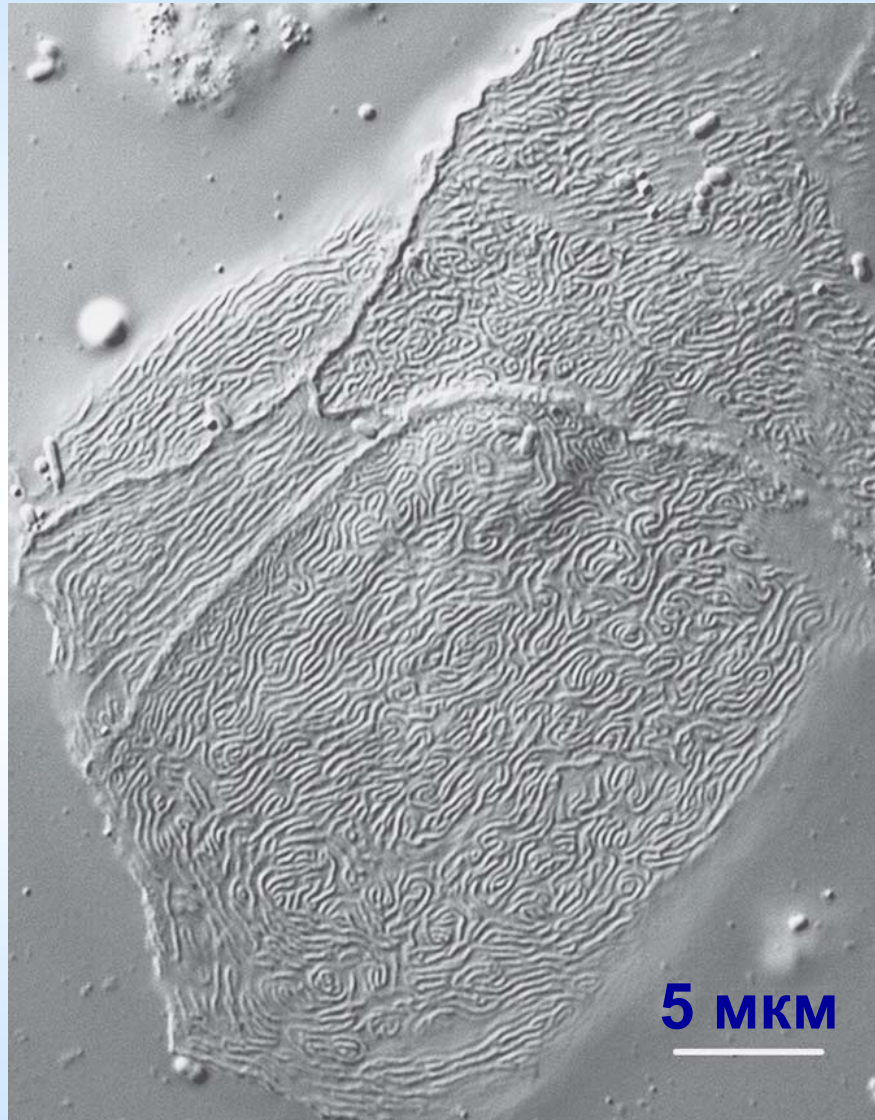
ДИК: Потеря смачиваемости (dewetting) подложки полимерной пленкой



Оптическая микроскопия: дифференциально-интерференционный контраст (ДИК). Потеря смачиваемости стеклянной подложки пленкой низкомолекулярного полистирола. **Толщина** полимерной пленки **19 нм**. Масштабная линия **50 мкм**.

Изображения ДИК микроскопии

клетка ротового эпителия



микротрубочки

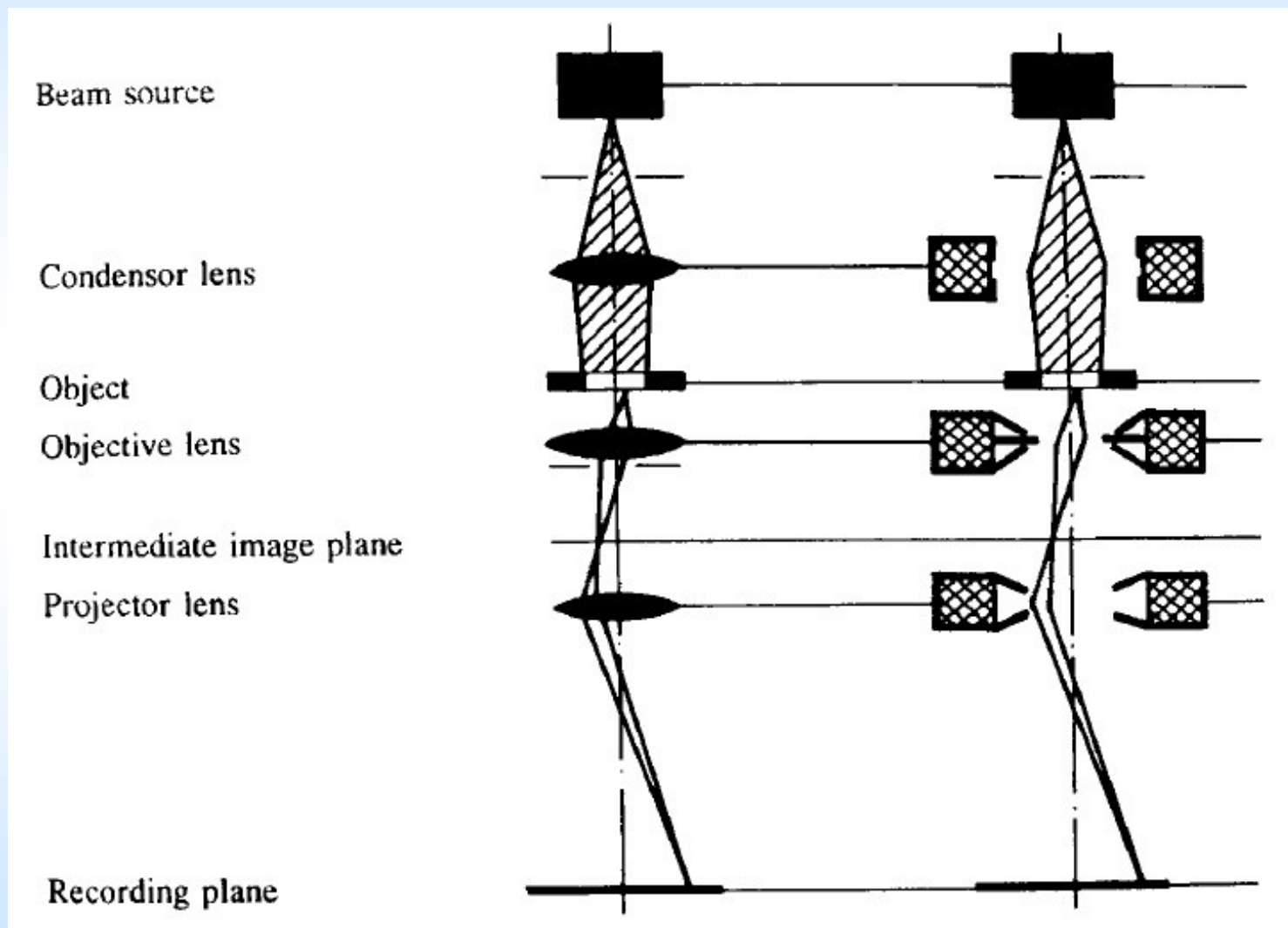
План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

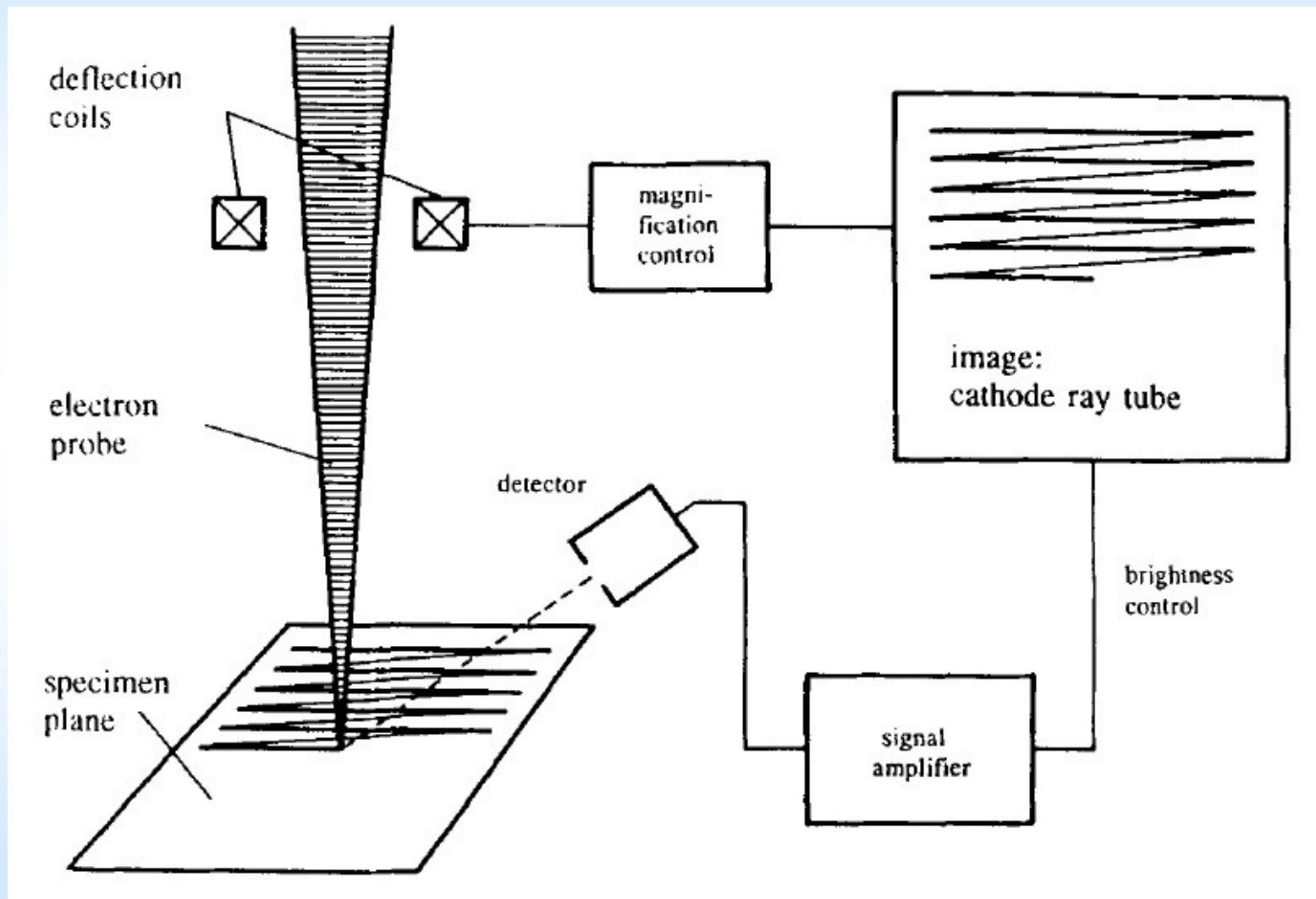
Актуальность сопоставления ССМ и ЭМ

- Прогресс в развитии методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии
 - Автоэмиссионный катод
 - Пространственная и временная когерентность пучка, контрастность, снижение хроматической aberrации (ПЭМ)
 - Исследование диэлектриков, диаметр пучка до 4 Å, нанометровое разрешение (СЭМ)
 - Энергетические фильтры (ПЭМ)
 - Контрастность, элементный анализ
 - Аппаратная коррекция aberrаций (ПЭМ)
 - Методы фазового контраста, математического анализа изображений, томография (ПЭМ)
 - Исследования в растворе (крио ПЭМ)
 - Секционирование ФИП (СЭМ)

Принцип ПЭМ



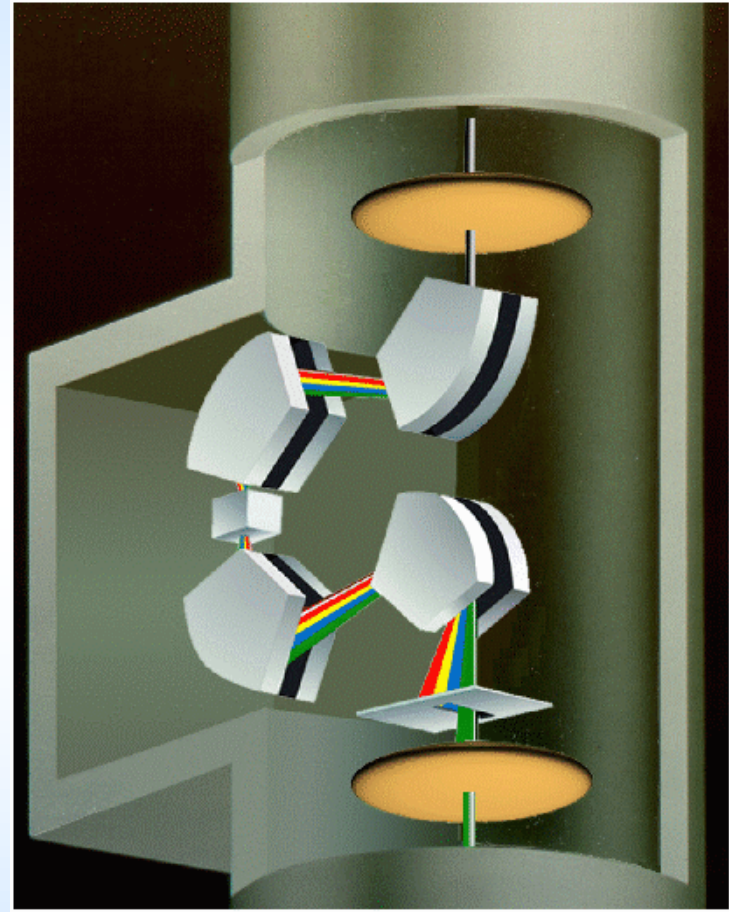
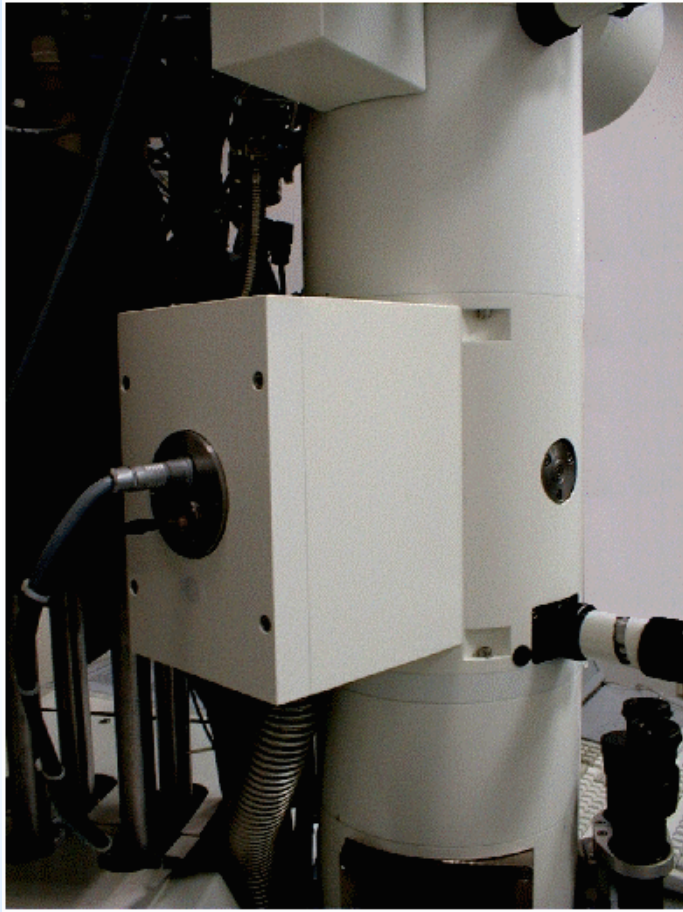
Принцип СЭМ



План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - **Возможности элементного анализа в ПЭМ**
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Возможности элементного анализа в ПЭМ

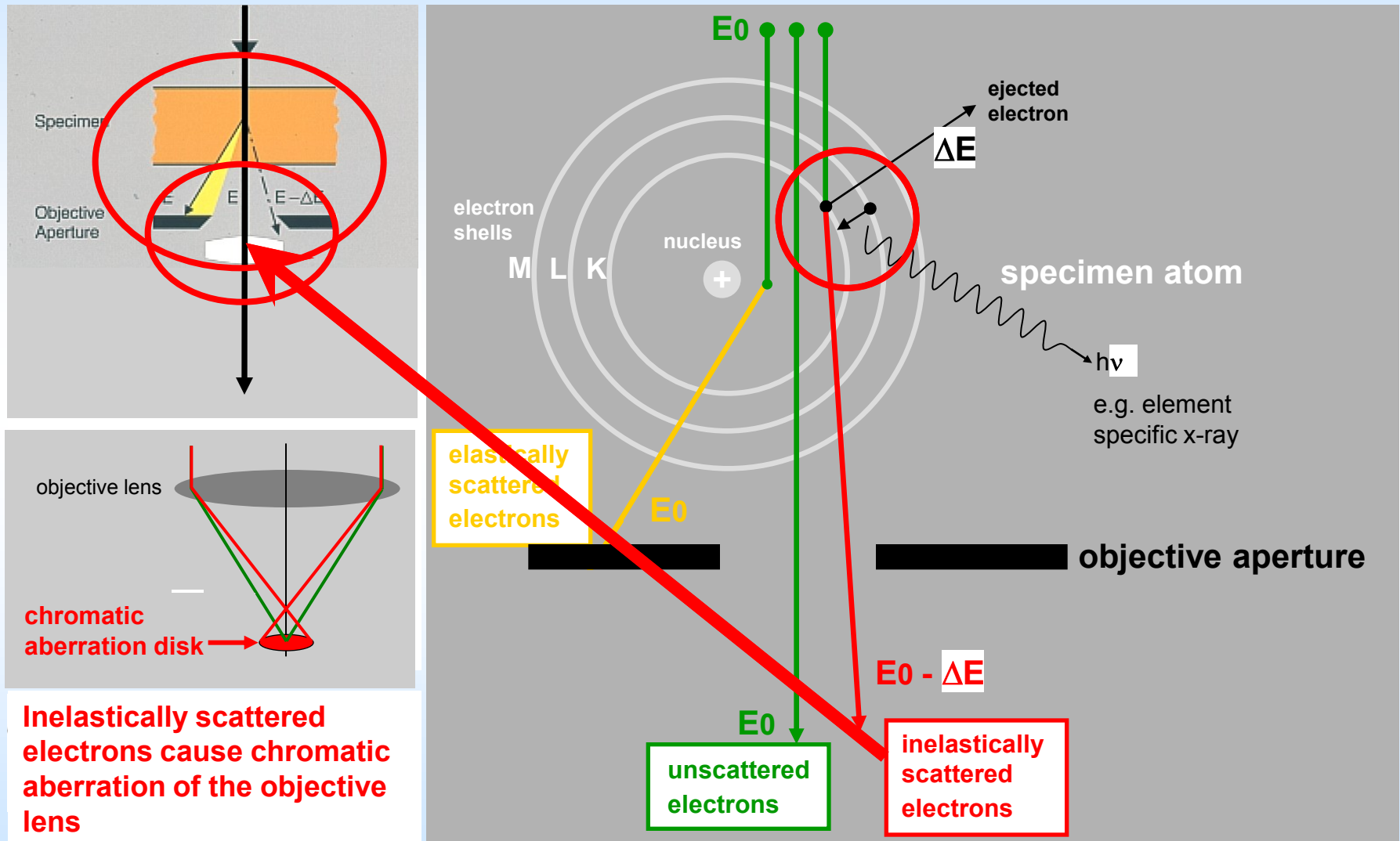


Persistently integrated into column of TEM

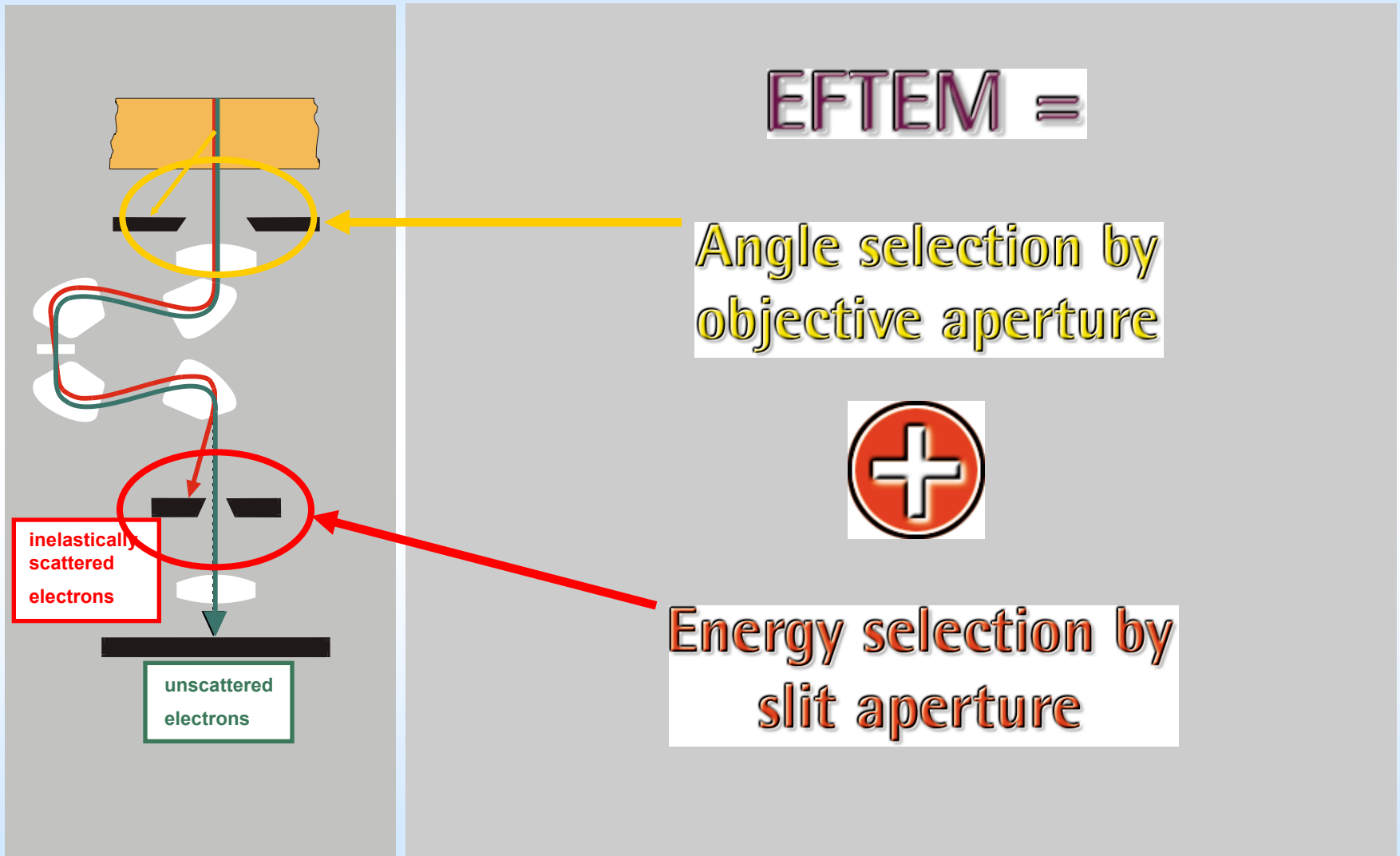
Factory aligned, no user alignment

1:1 imaging unit: No post-magnification factor

Принцип элементного анализа в ПЭМ



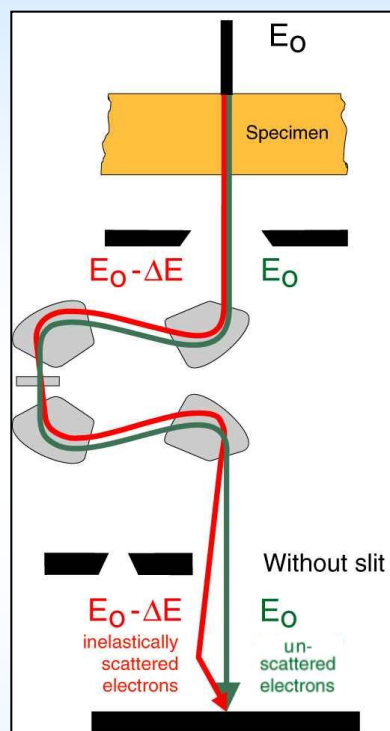
Работа энергетического фильтра в ПЭМ



Работа энергетического фильтра в ПЭМ

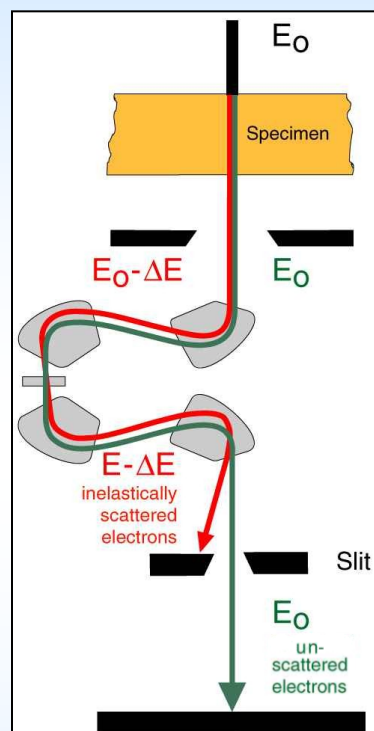
Angle
selection

Energy
selection



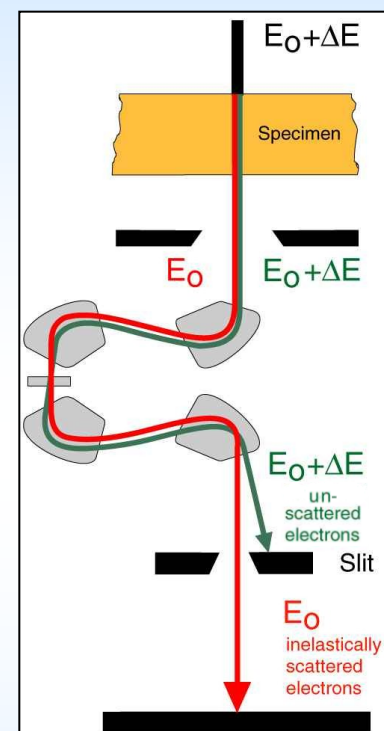
Imaging with
all electrons

Global imaging
GBF



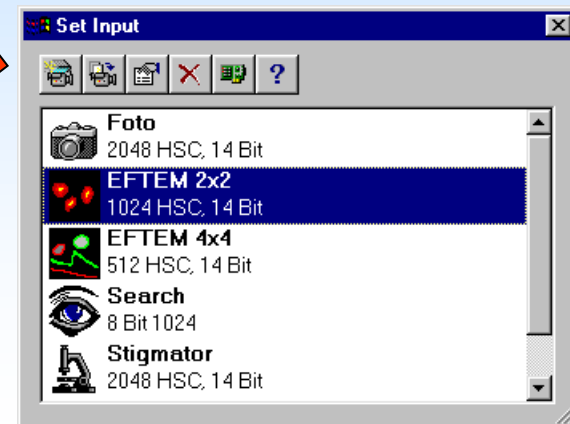
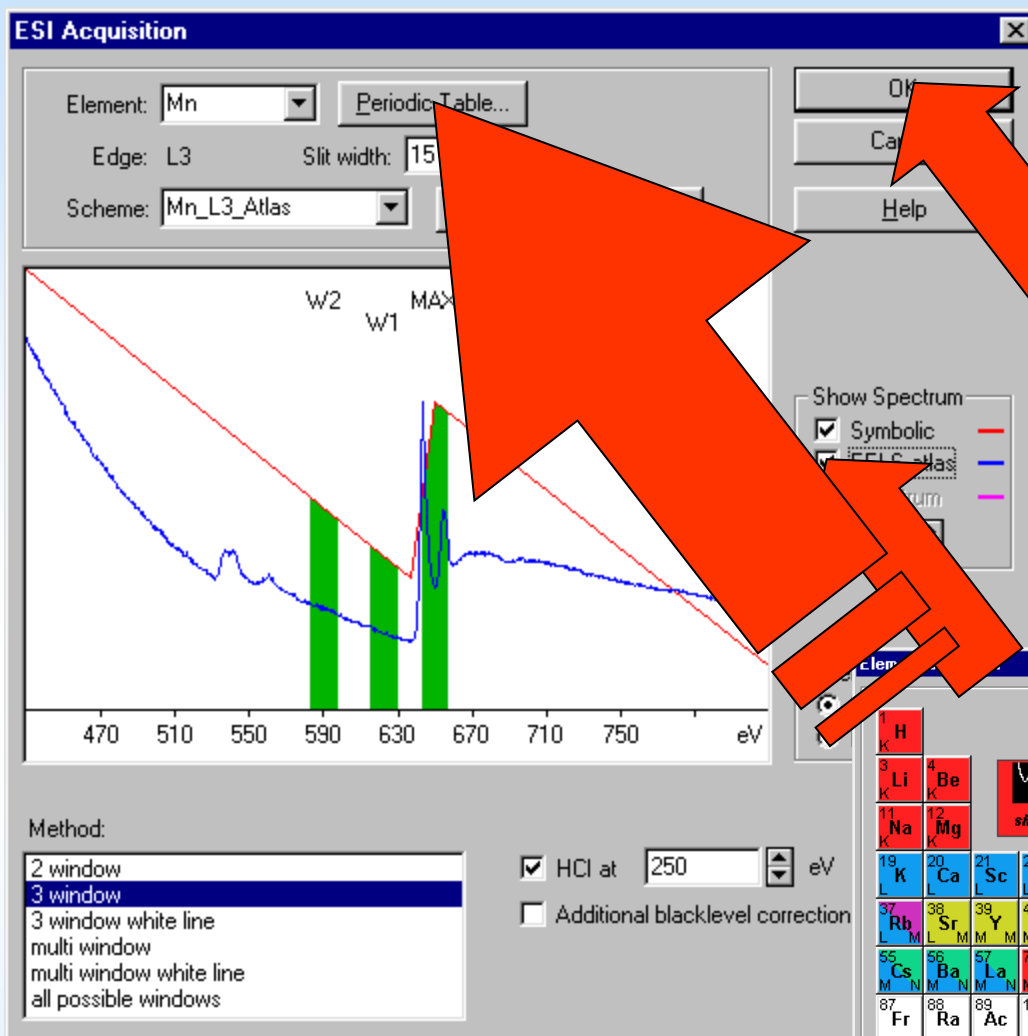
Imaging with
zero loss electrons

Elastic imaging
EBF



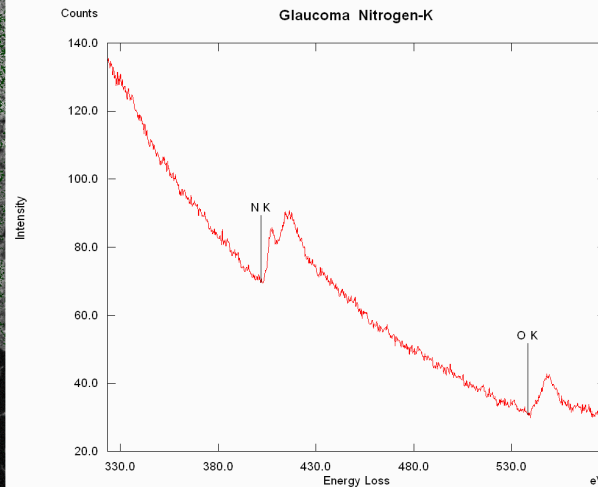
Imaging with
energy loss electrons

Electron spectroscopic
imaging
ESI



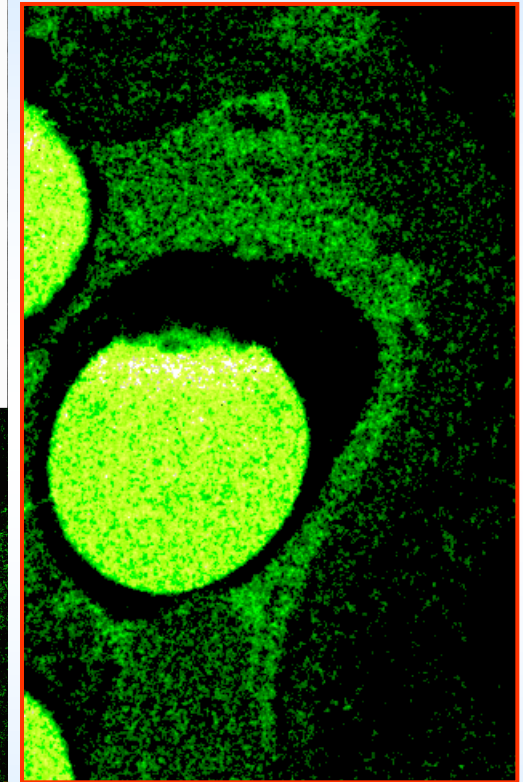
**ESI Acquisition
with ESIVISION 3.2**

ESI and Parallel EELS at the Nitrogen-K edge



N overlaid to HCl Parallel EELS

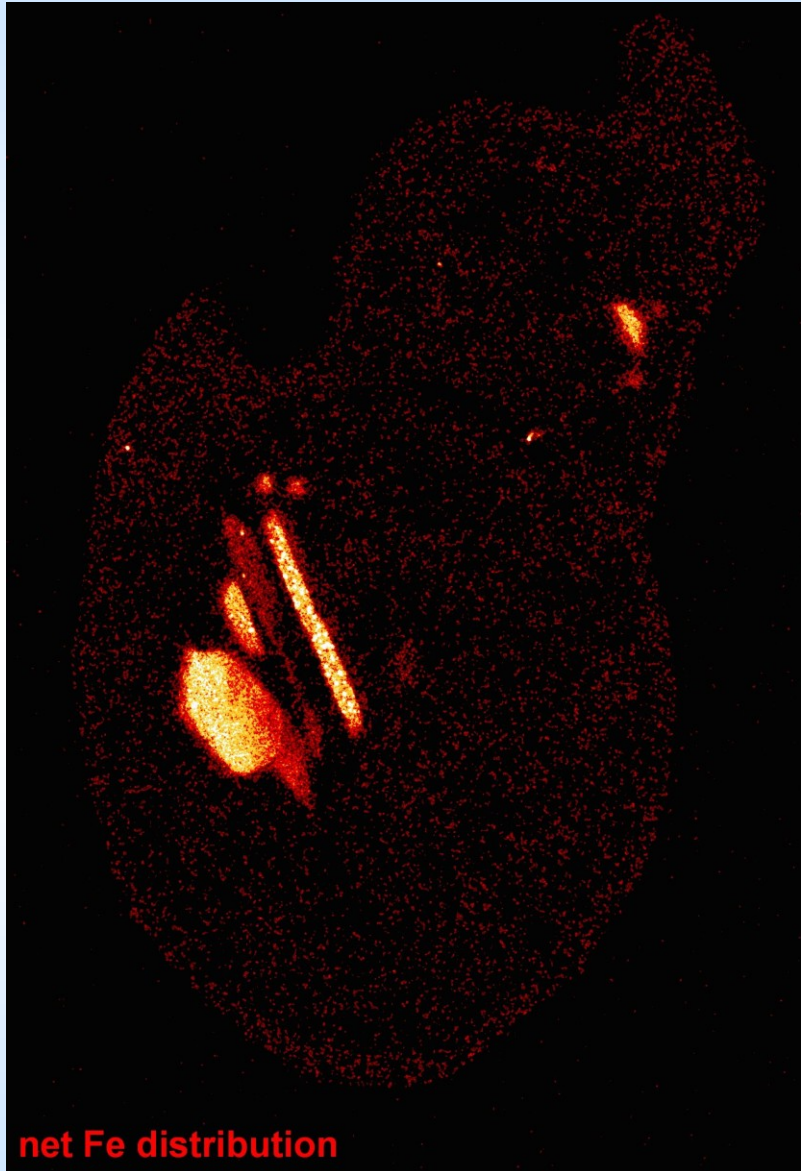
HCl net N



Euplotes spec. (Ciliate)

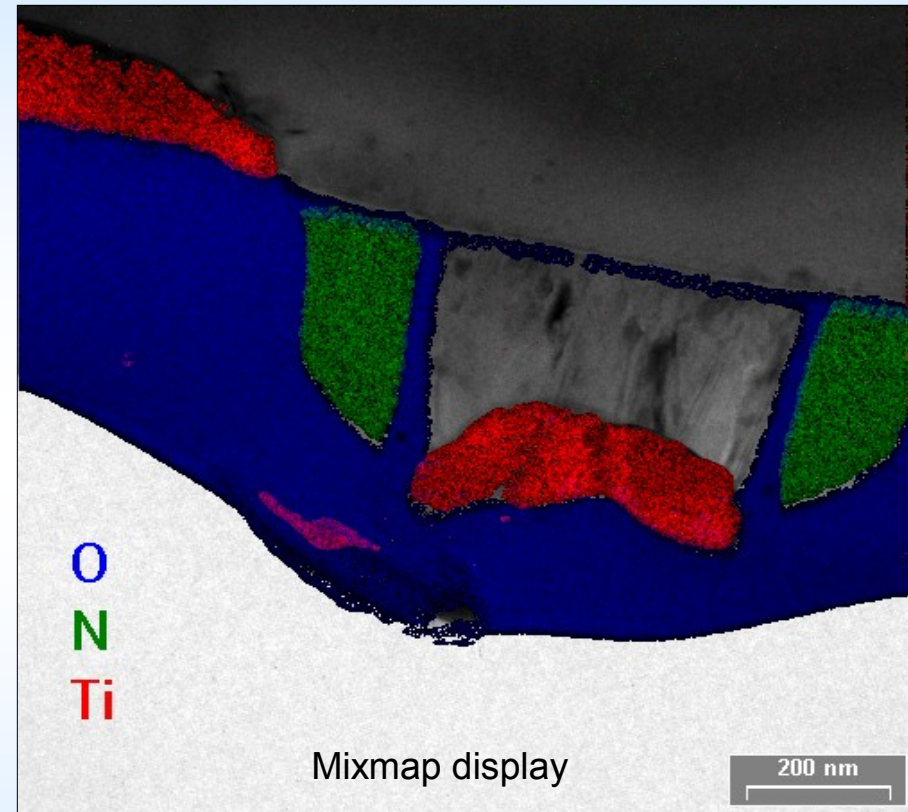
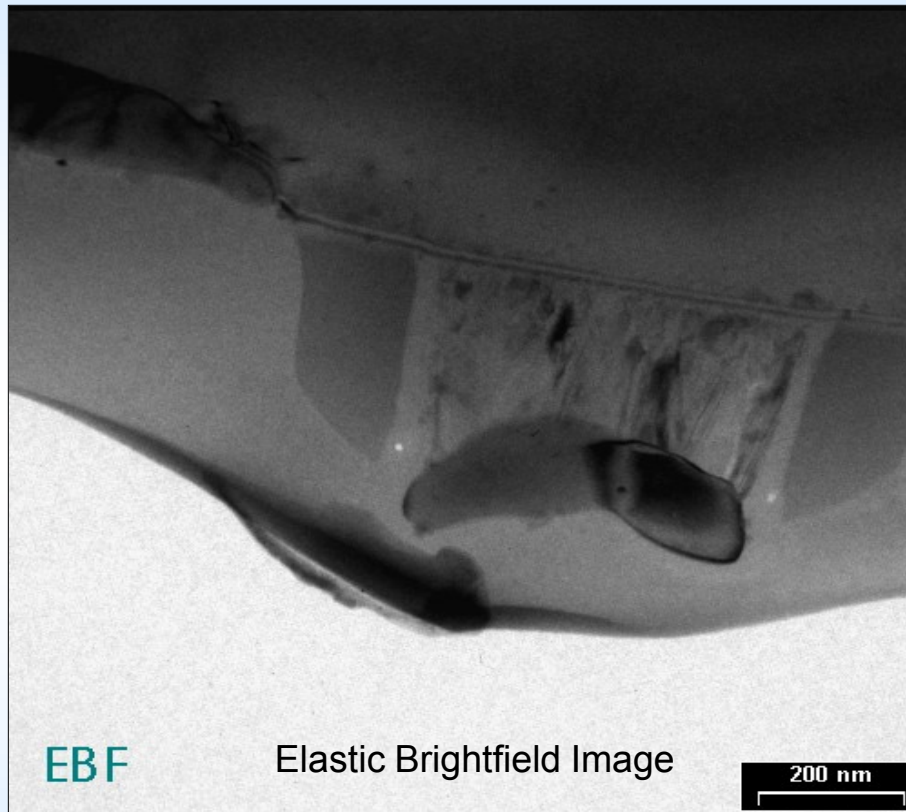
Nitrogen distribution map
(1024x1024) and Parallel EELS

Plasmodium (malaria) in a red blood cell: Accumulation of iron



Specimen by courtesy of B. Trevor Sewell, Cape Town

Superposition of **O**, **N** and **Ti** distribution to EBF



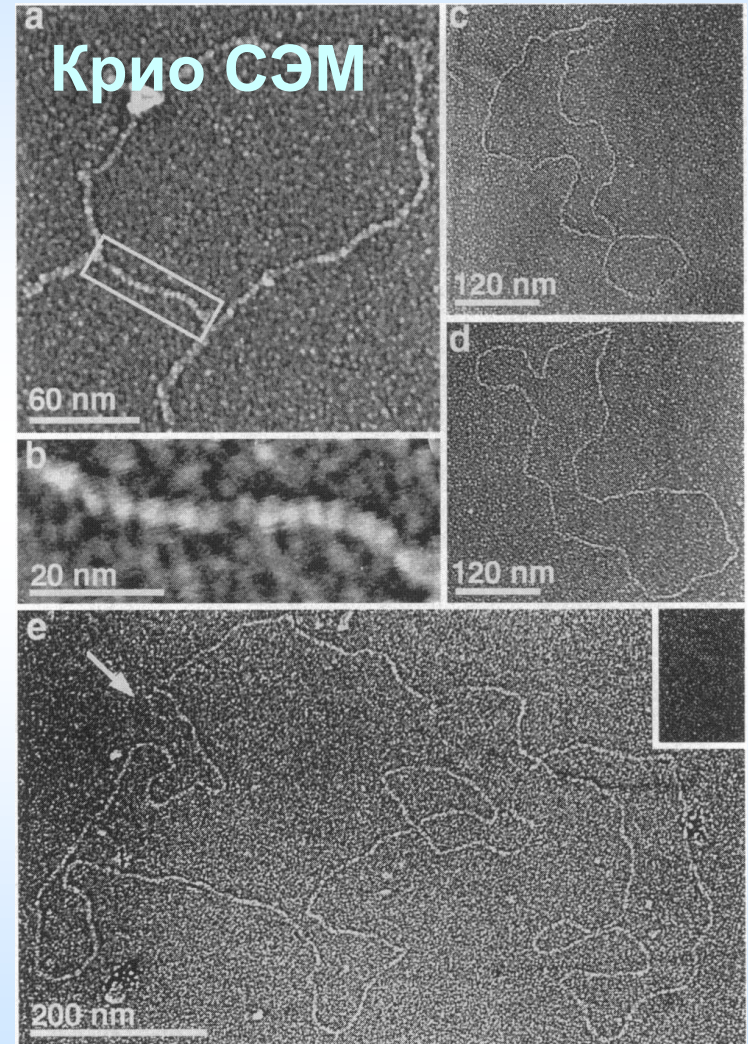
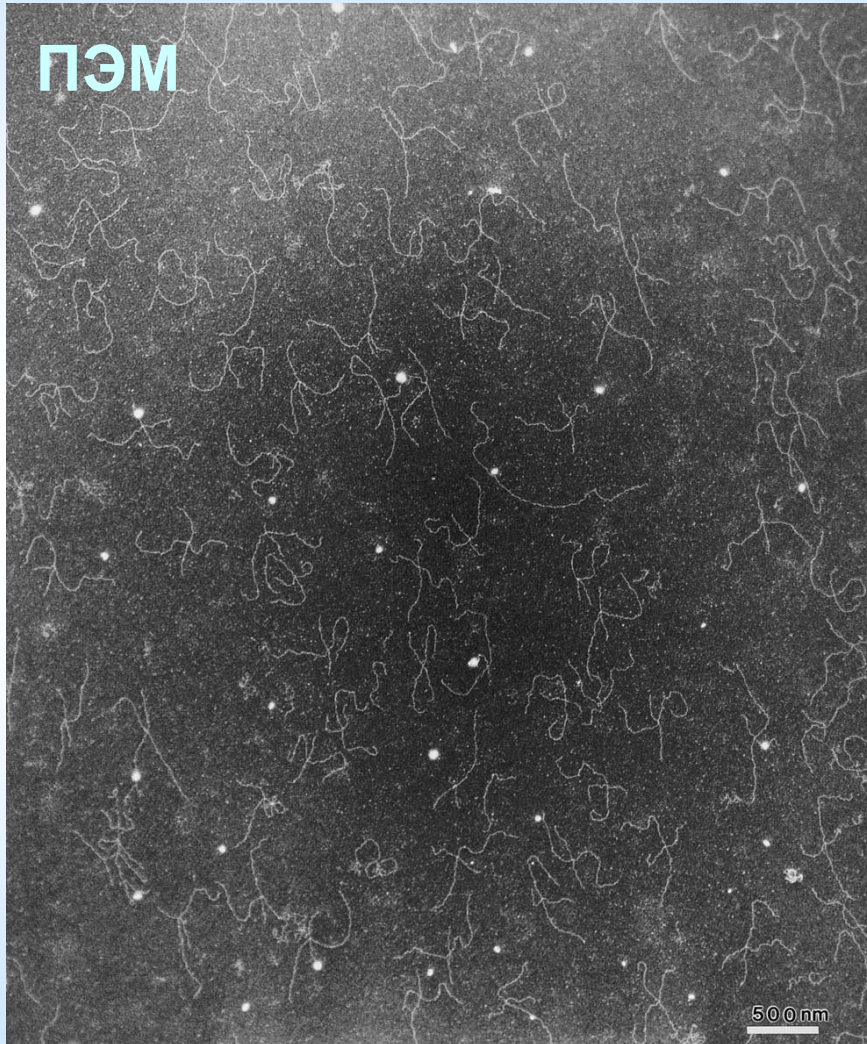
**ESI Combine Images
with ESIVISION 3.2**

Semiconductor specimen (DRAM): Respective elemental distribution images were calculated using 3-window power-law method

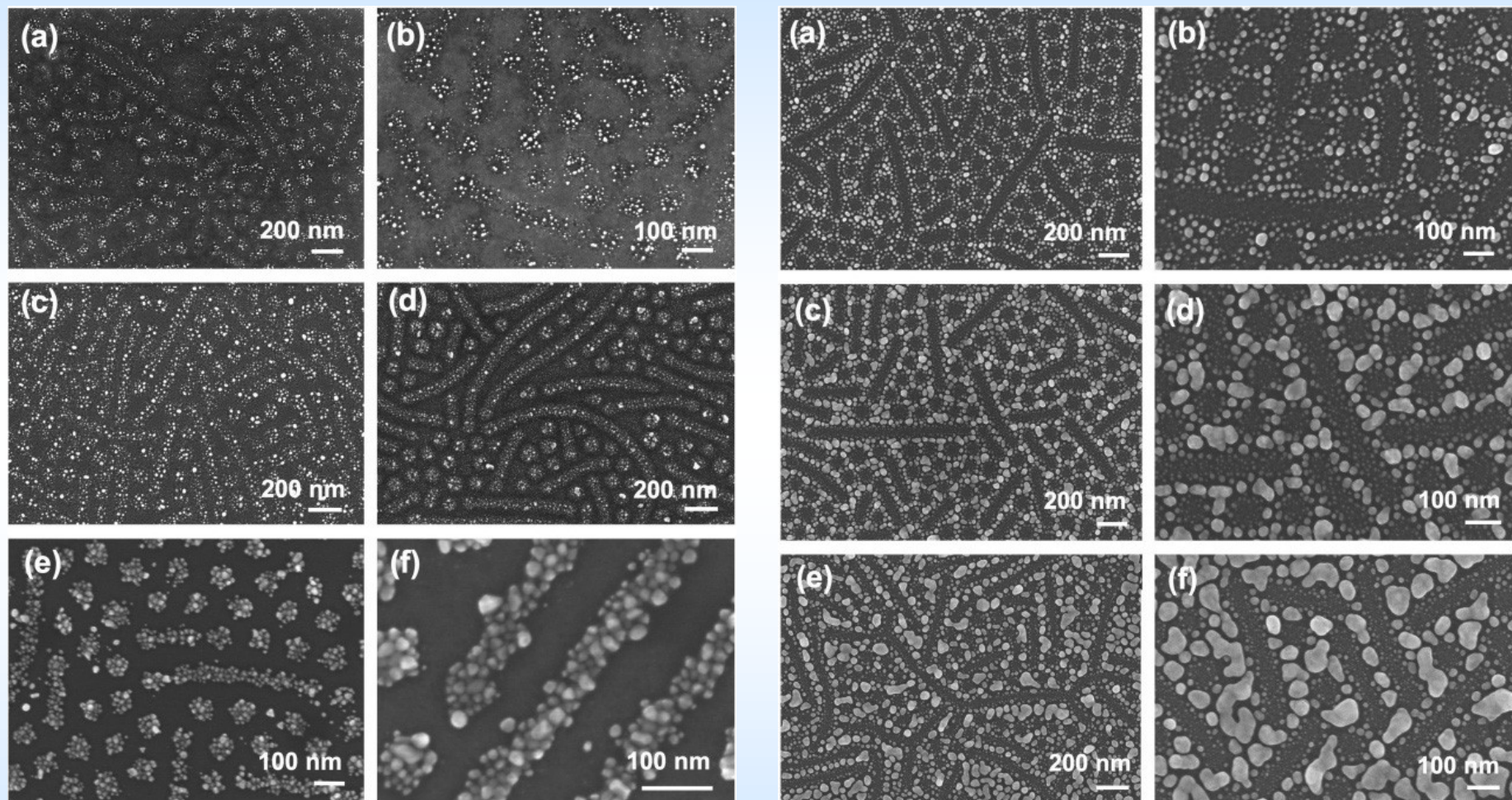
План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Микрографии ЭМ молекул ДНК



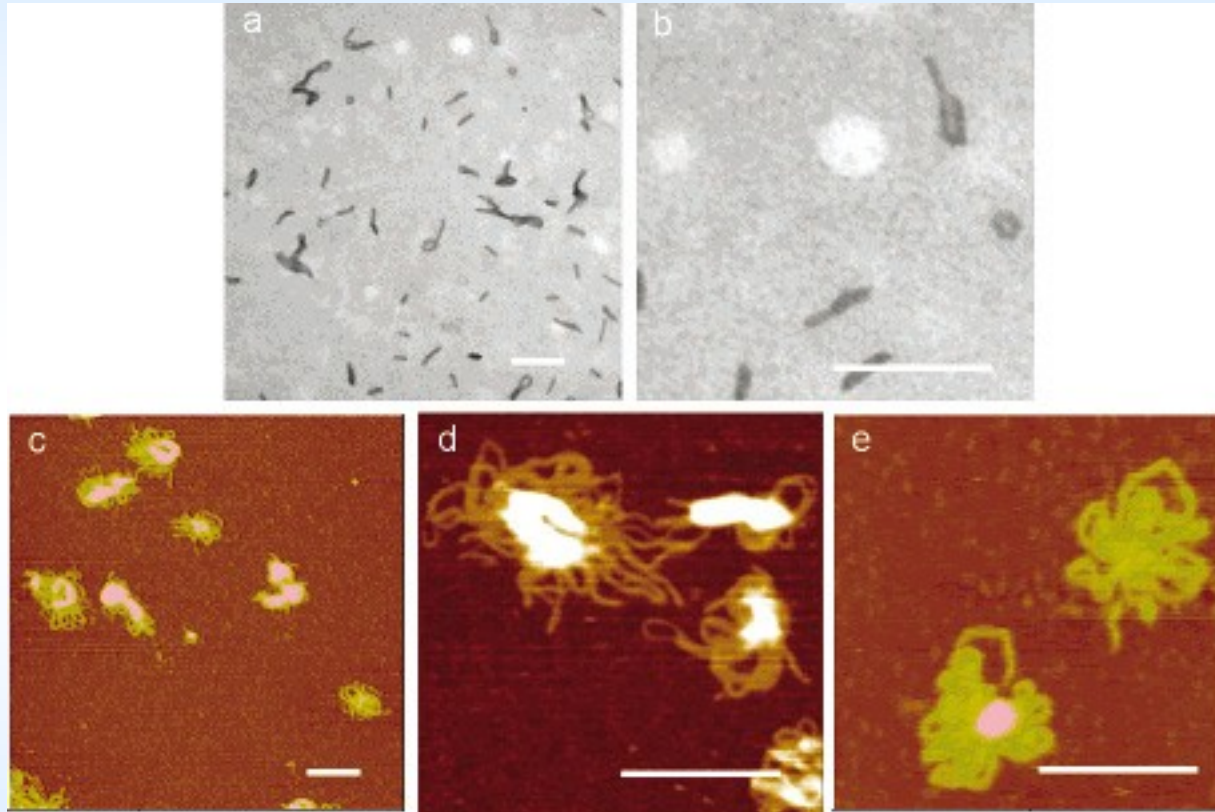
СЭМ Au-наноструктур



Синтез металлосодержащих наноструктур с использованием самоорганизованных регулярных триблоксополимерных (ПС-П2ВП-ПЭО) наноструктур в качестве темплейта

Aizawa & Buriak // J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 5877-5886

ССМ и ПЭМ изображения комплексов ДНК

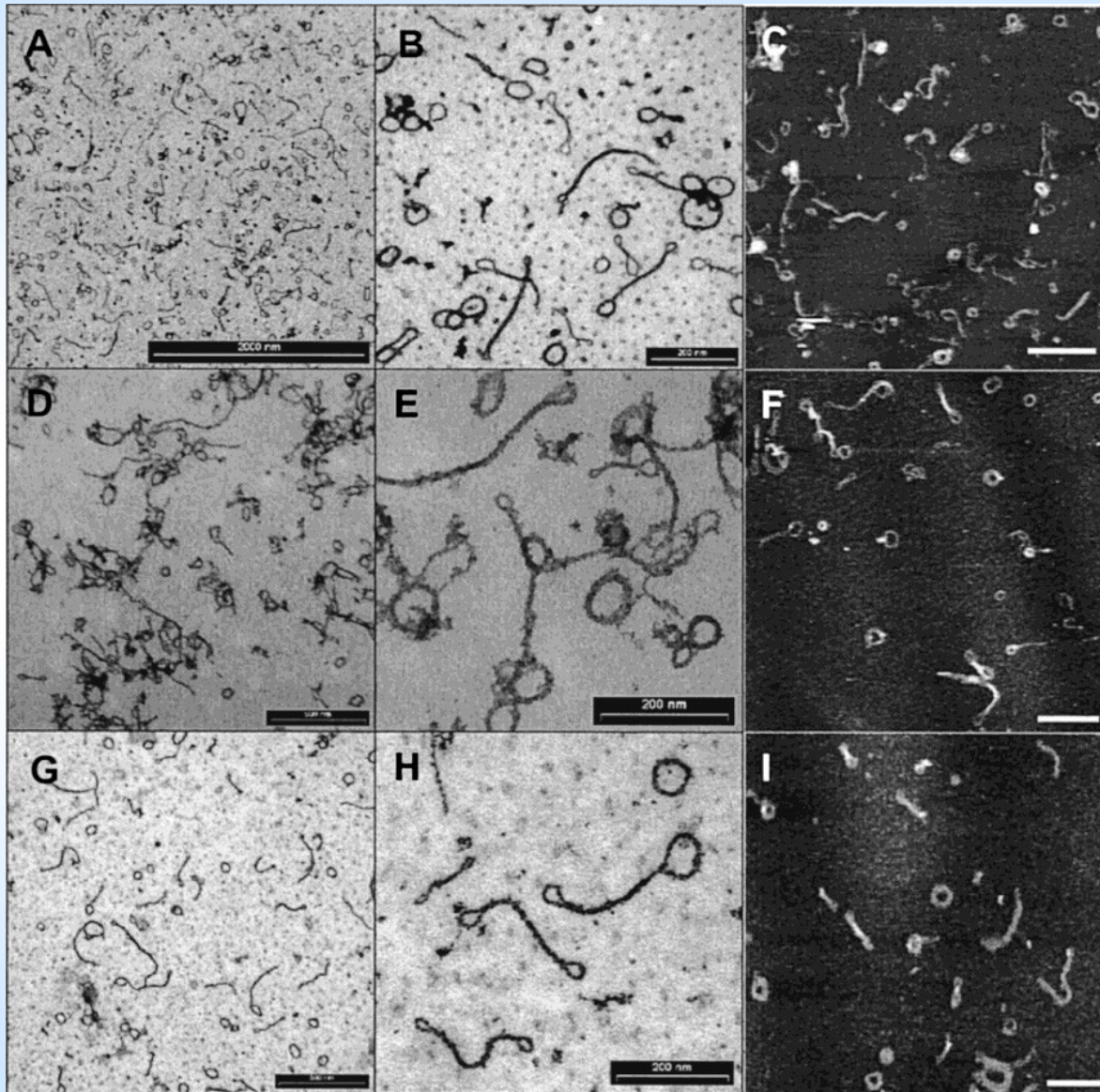


Молекулы ДНК конденсированы катионным сополимером. Разница в морфологии структур на микрографиях ССМ и ПЭМ может быть обусловлена либо высушиванием, либо контрастированием.

Масштабная линия **200 нм**

Chim *et al.* // Langmuir **2005**, 21(8), 3591-3598

ПЭМ и ССМ конденсатов молекул ДНК



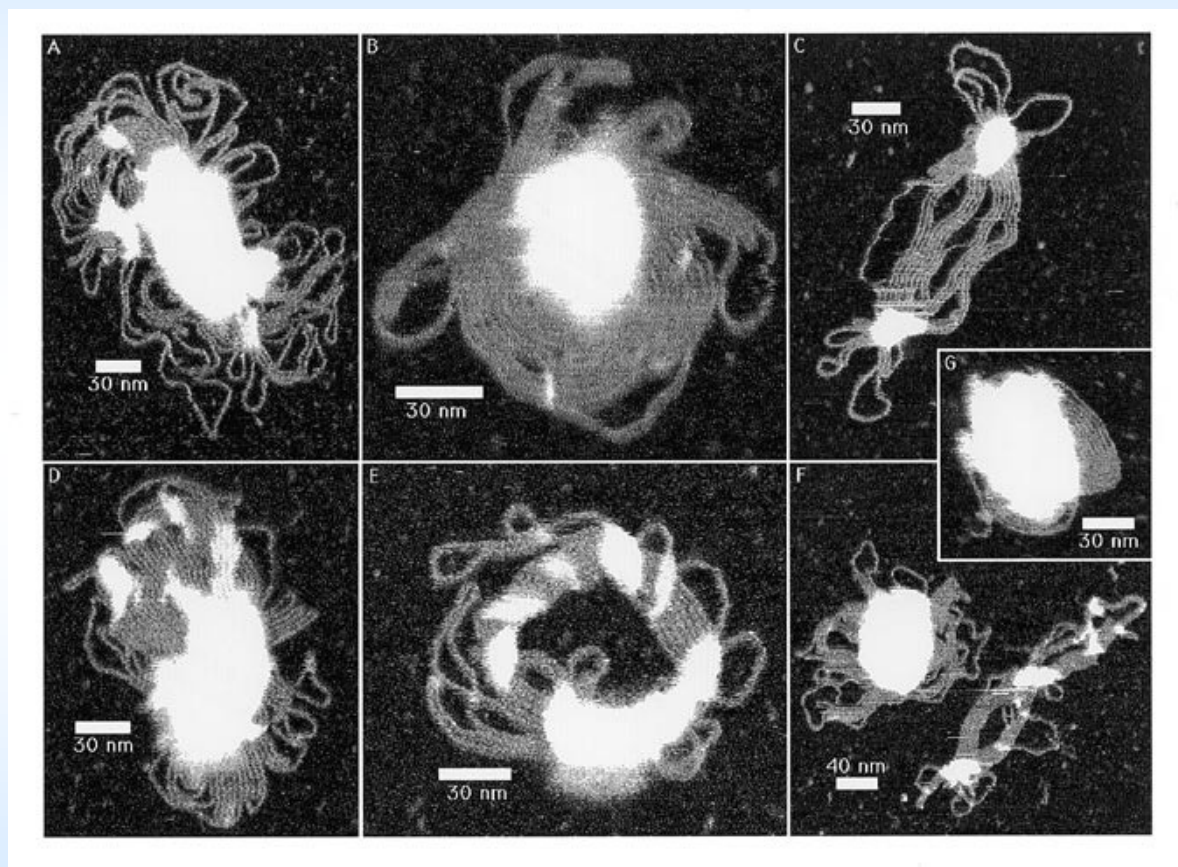
200 нм

500 нм

Молекулы ДНК
конденсированы
различными
катионными
сополимерами,
включающими ПЭГ и
полиамидоамин.

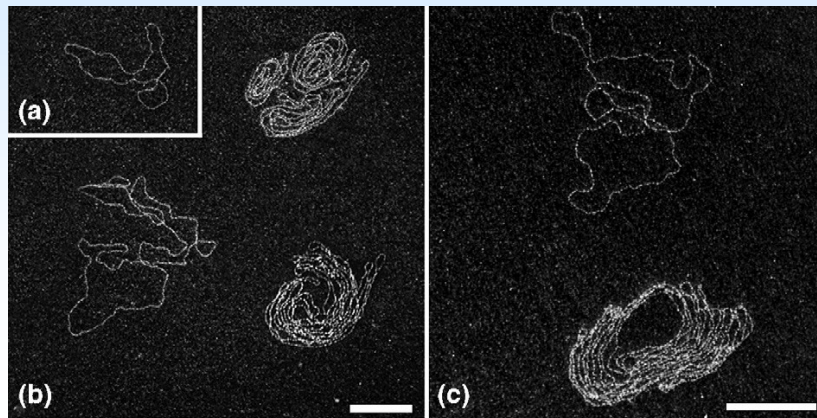
Rackstraw *et al.* //
Langmuir **2001**, 17, 3185

Типичные ССМ микрографии конденсатов молекул ДНК

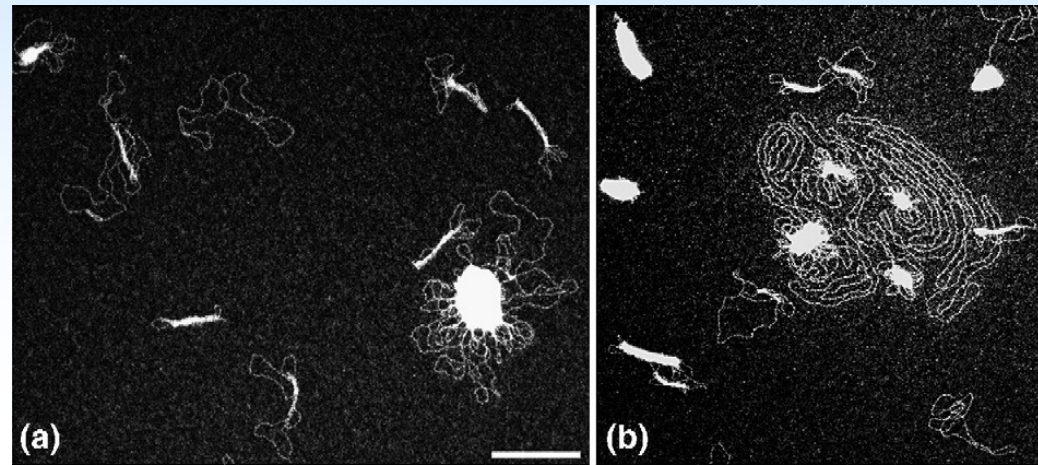


Молекулы ДНК конденсированы полиэтиленимином. Структуры нанесены на слюду и исследованы в водных растворах NaCl

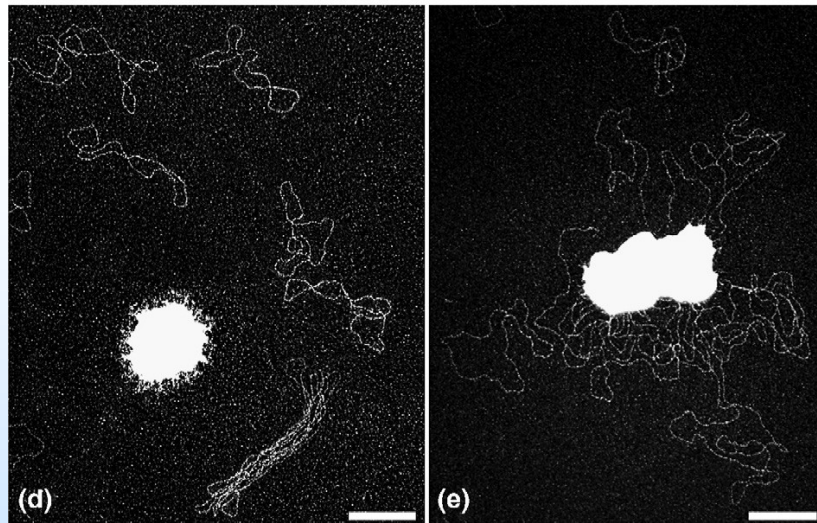
ПЭМ визуализация комплексов молекул ДНК с белками



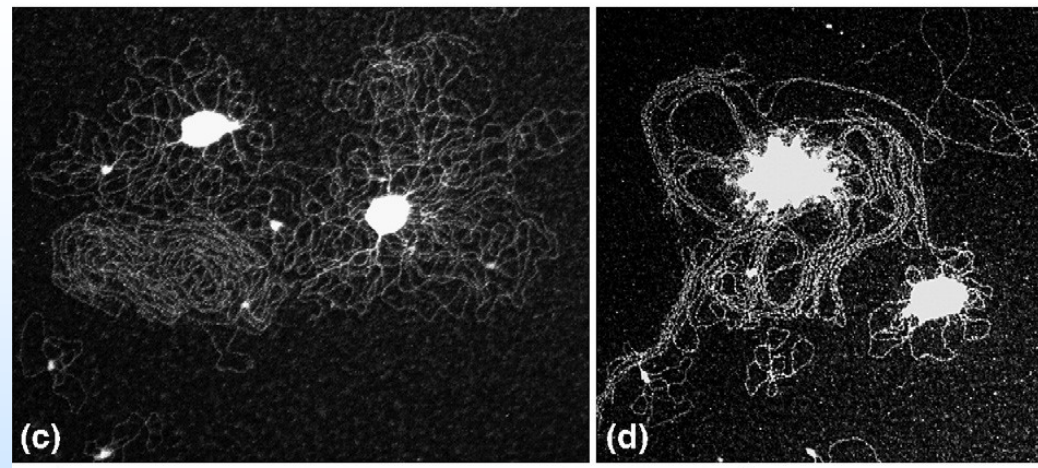
NCp7 + dsDNA + Mg^{2+}



NCp7 + dsDNA without Mg^{2+}



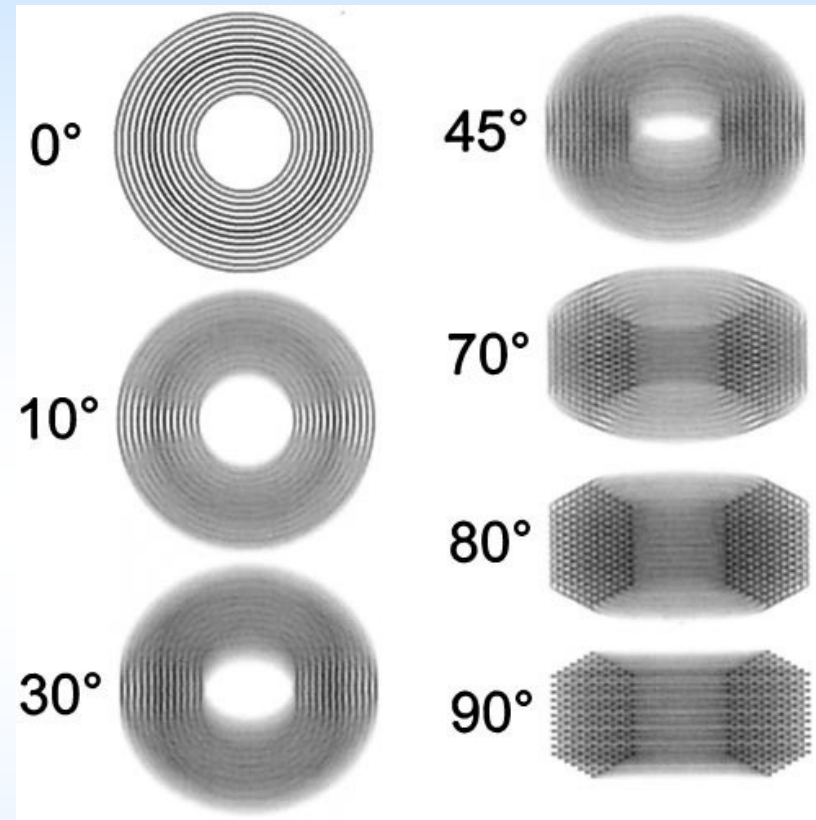
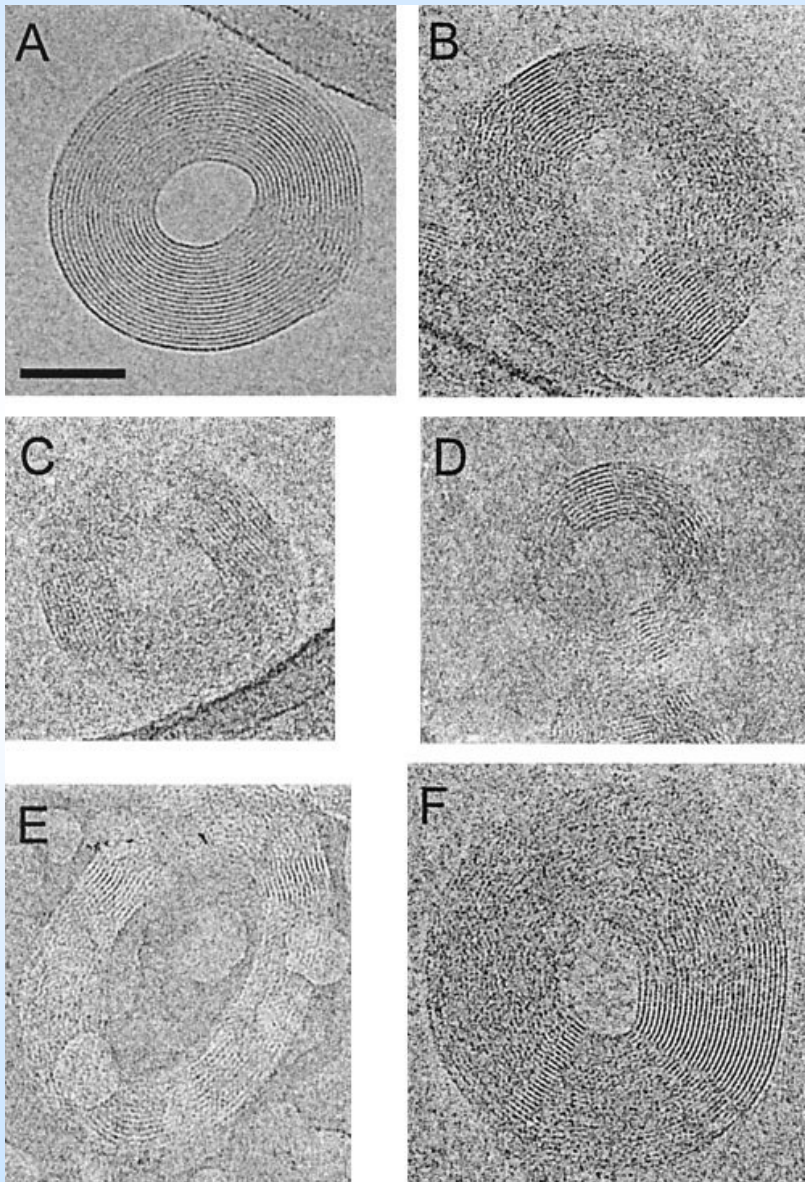
NCp7 + ssDNA + dsDNA Mg^{2+}



NCp7 + ssDNA + dsDNA without Mg^{2+}

Масштабная линия 150 нм

Микрографии ПЭМ конденсатов ДНК



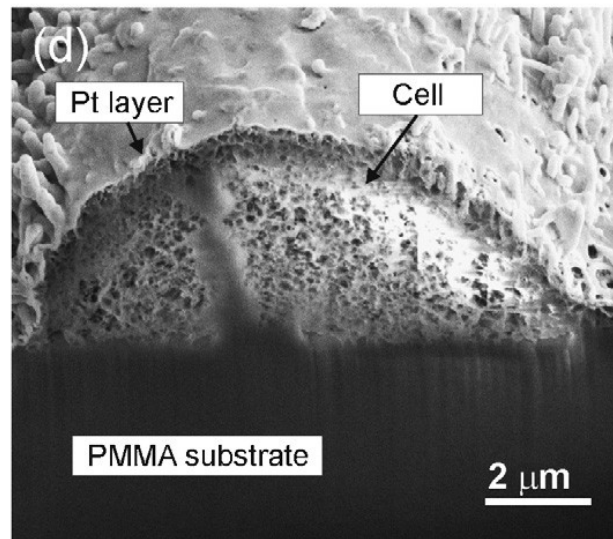
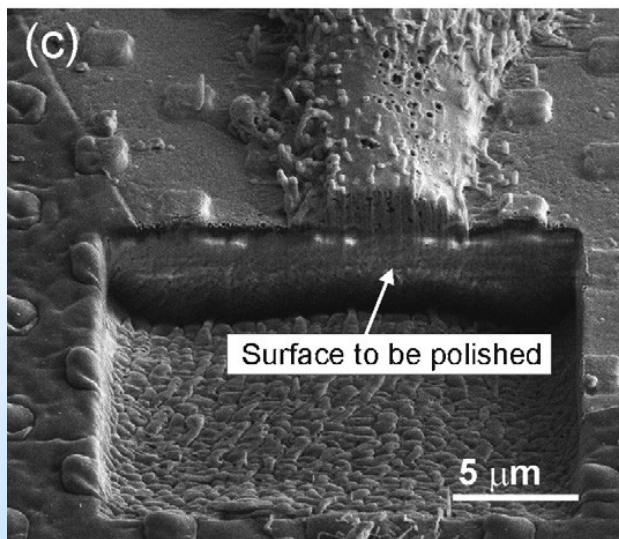
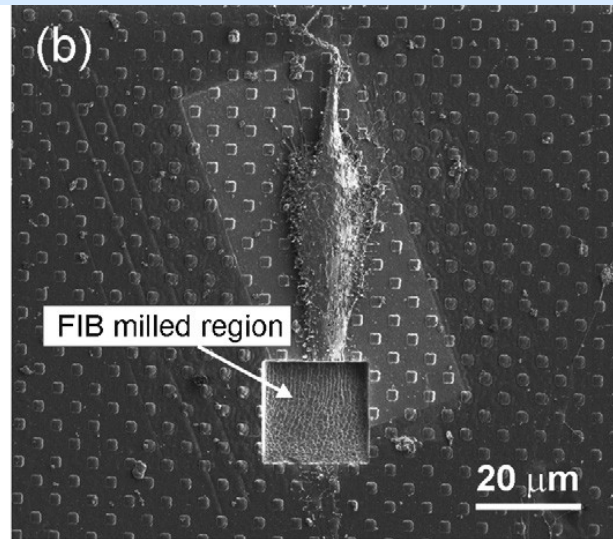
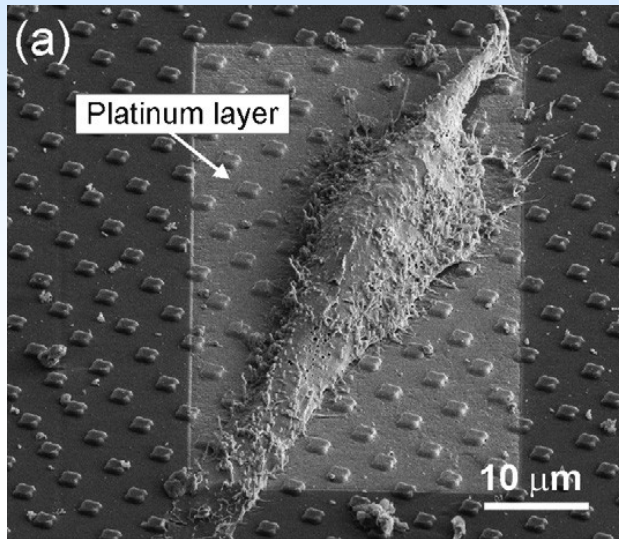
Крио ПЭМ, восстановление
внутренней трехмерной
структуры

Hud & Downing // PNAS **2001**, 98(26), 14925

План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (SSM)
 - Погрешности визуализации в SSM
 - Информативность SSM
 - Дополнительные аналитические возможности SSM
 - Сопоставление SSM и STM
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление SSM с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами SSM
 - **Анализ внутренней трехмерной структуры**
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость SSM
 - Исследование динамики процессов на подложке

Сочетание СЭМ и ионных пучков

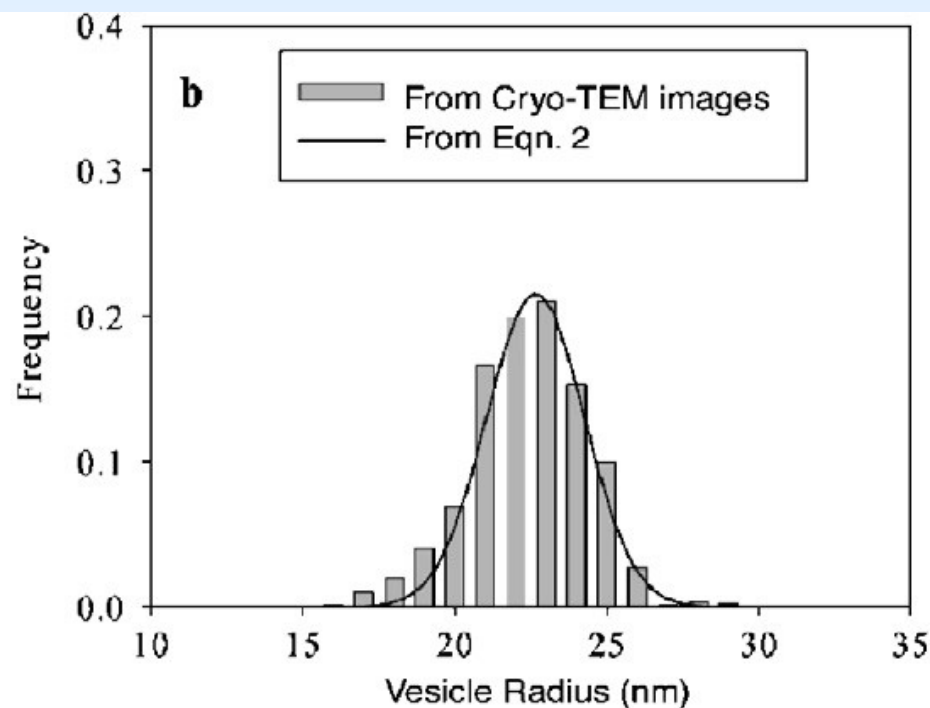
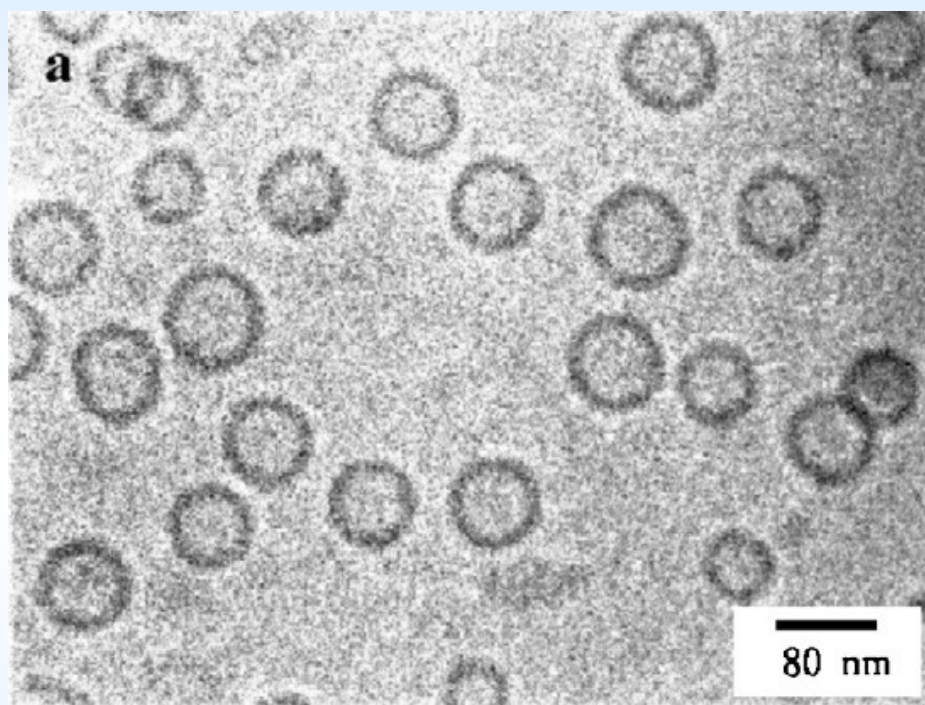


Секционирование образца с помощью сфокусированного ионного пучка (FIB) непосредственно в процессе исследования позволяет выявить **внутреннюю трехмерную структуру** (на примере клетки костной ткани)

План доклада

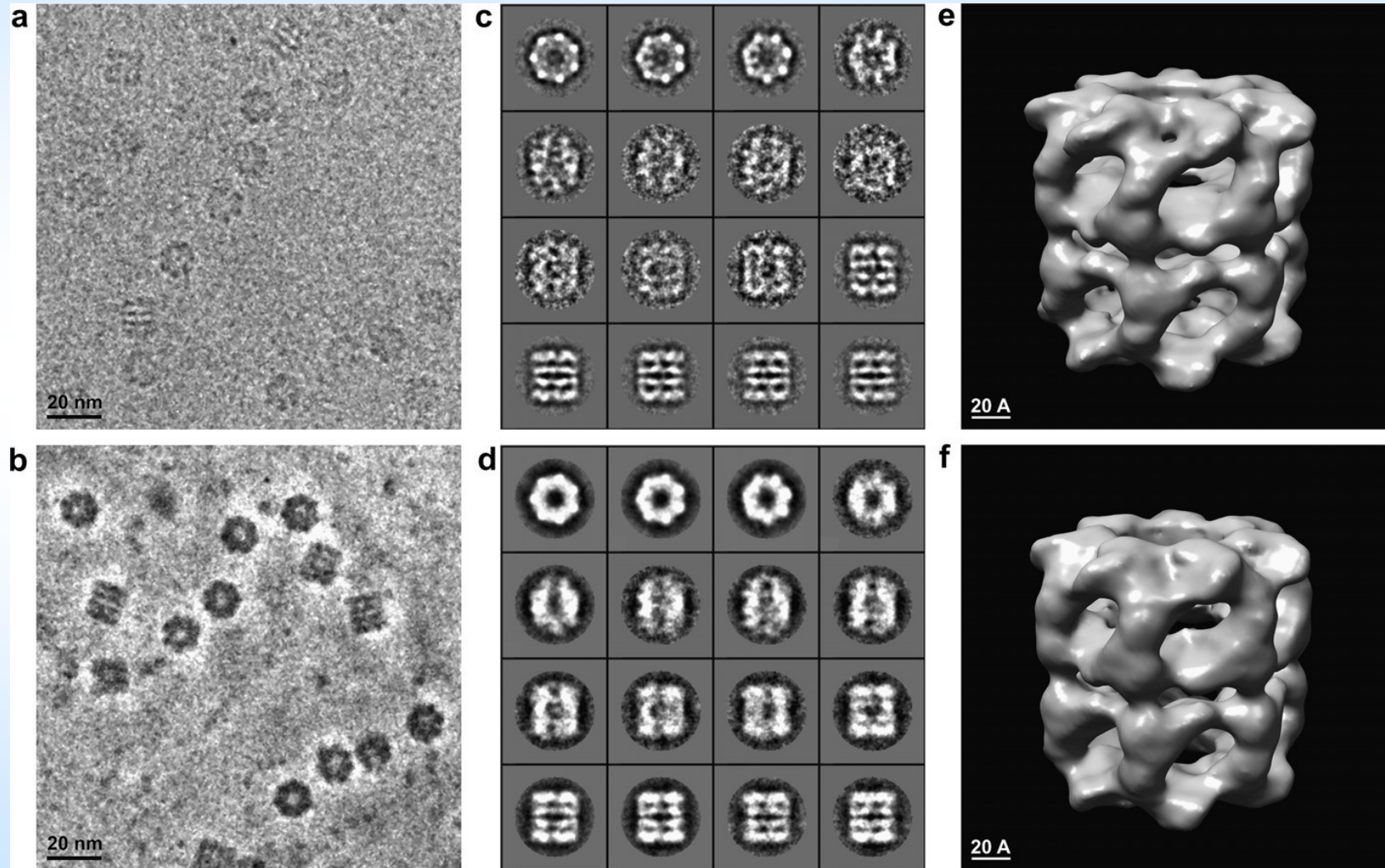
- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - **Крио ПЭМ, новые возможности**
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Крио ПЭМ: универсальный инструмент анализа нанобъектов

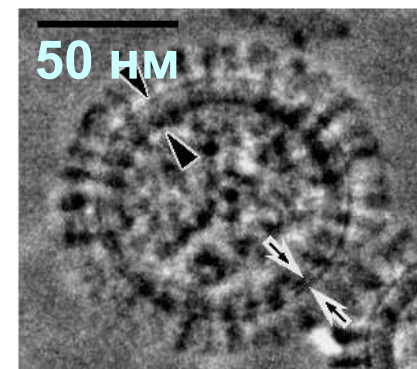
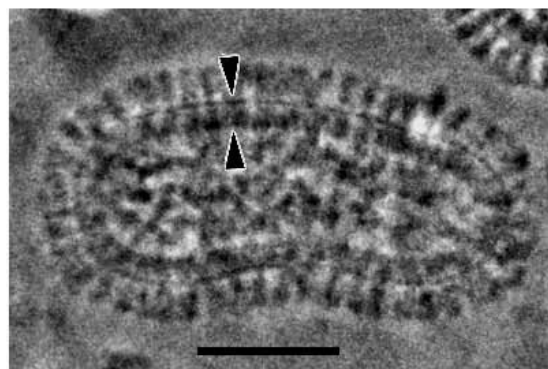
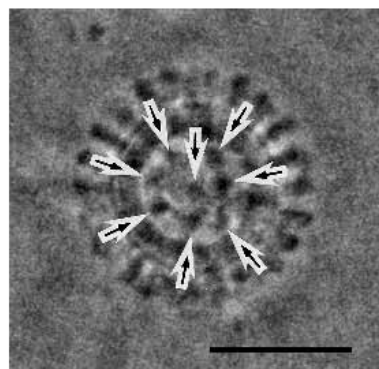
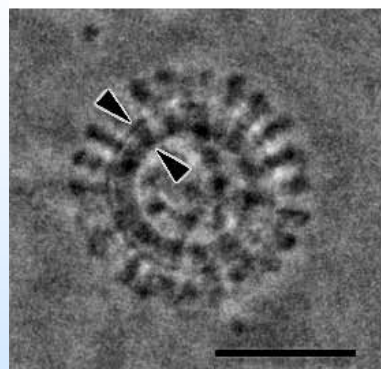
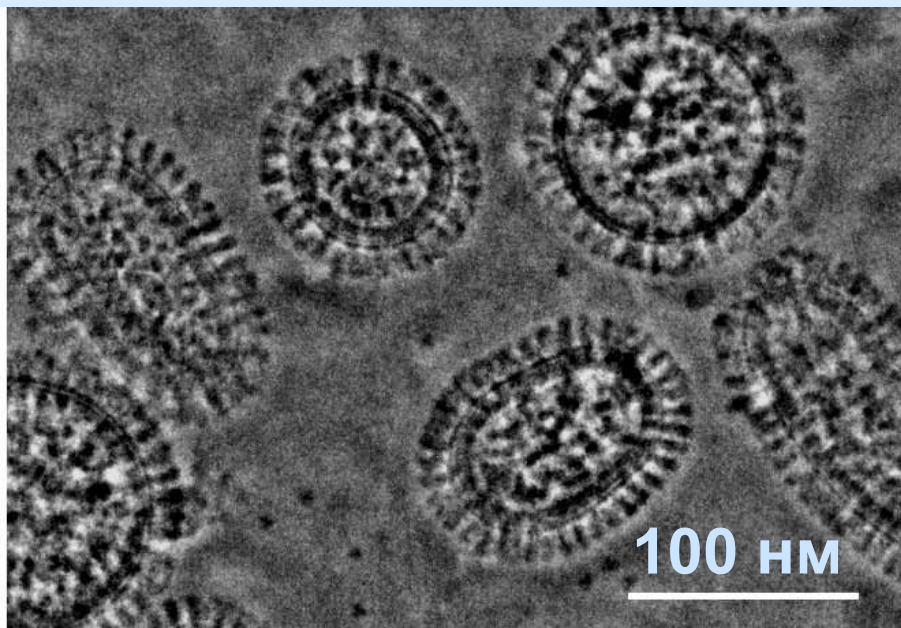
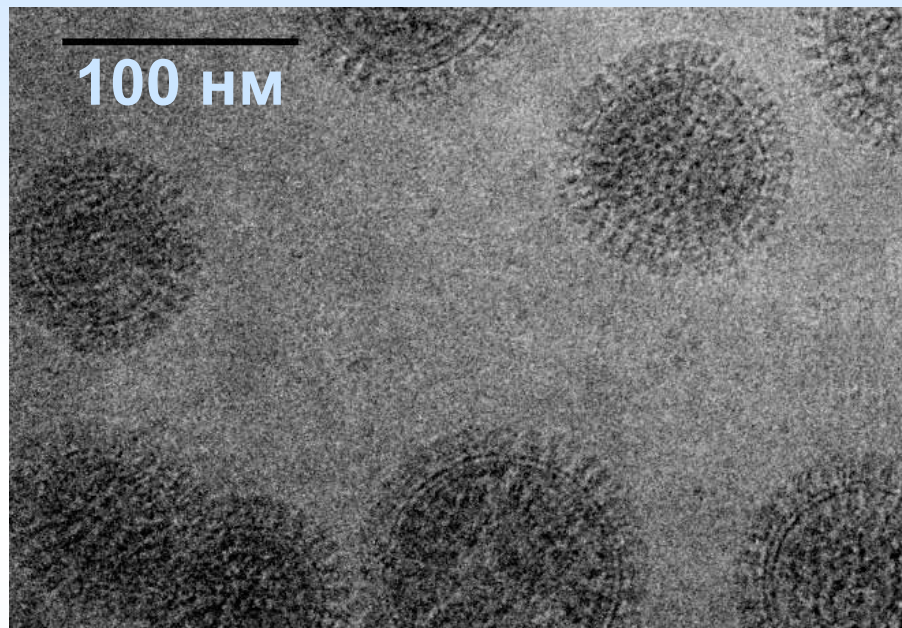


Монодисперсные везикулы, сформированные смесью перфтороктаноата натрия и бромида цетилтриметиламмония, диаметром ок. 50 нм (быстрая заморозка в тонкой пленке растворителя).

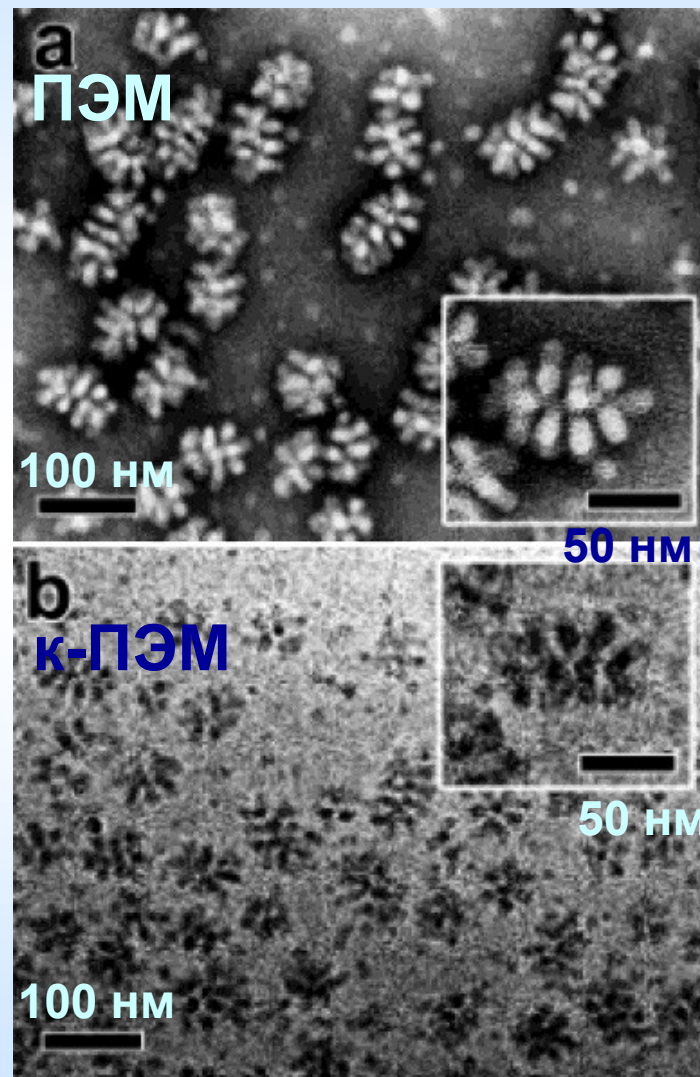
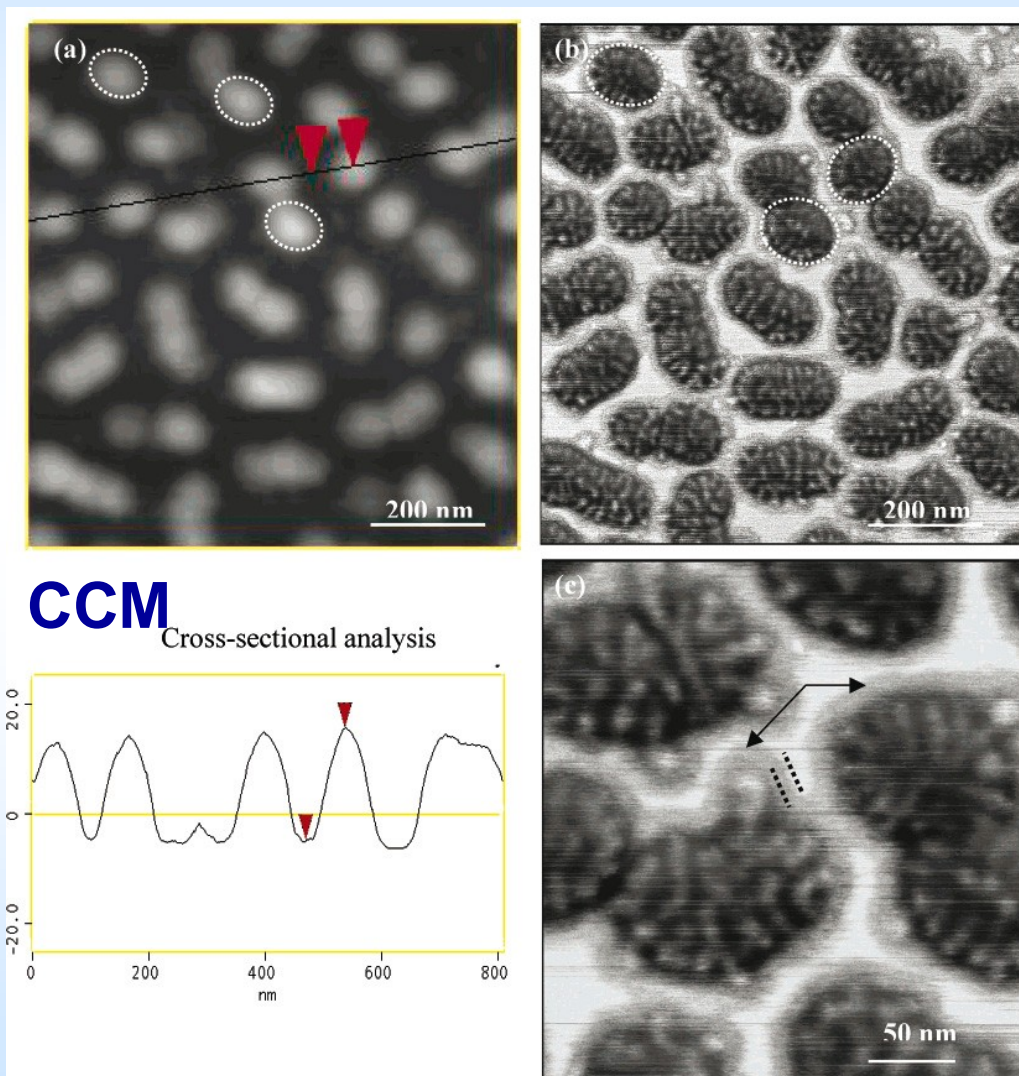
Крио ПЭМ: внутренняя трехмерная структура молекул белка



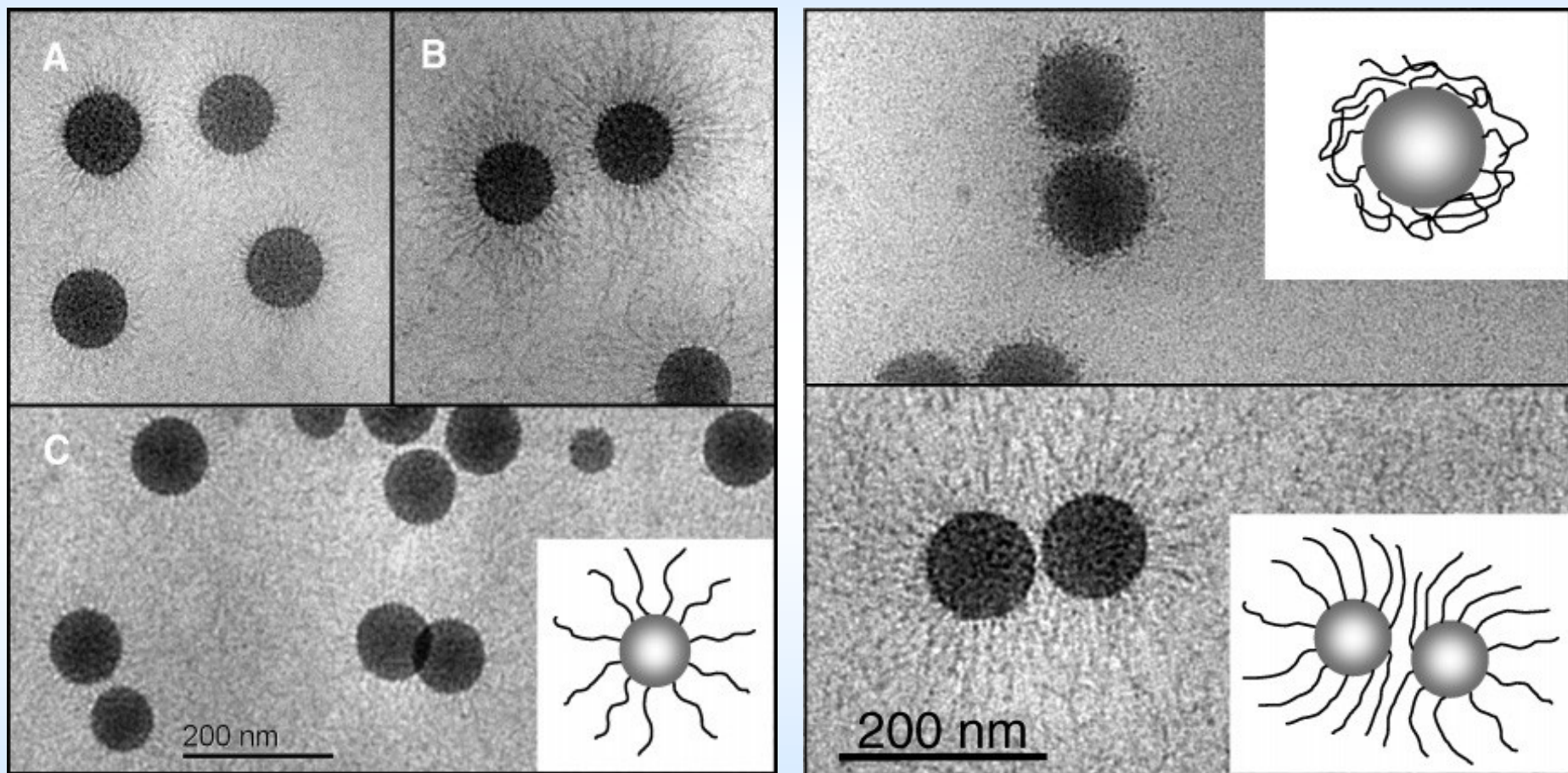
ПЭМ визуализация вирусных частиц



ССМ и ПЭМ гребнеобразных молекул



Крио ПЭМ: визуализация линейных цепей ПСС



В присутствии ионов Cs и/или белковых молекул БСА,
при разной ионной силе

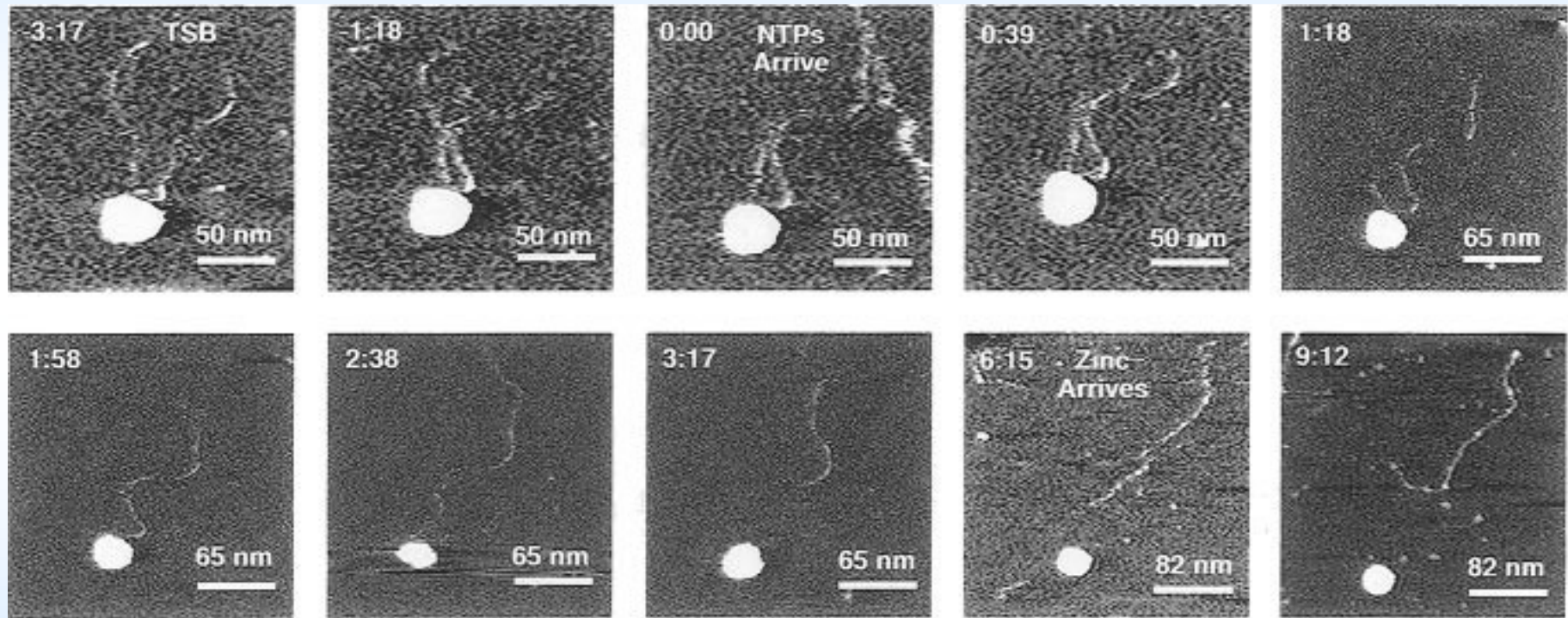
Методы микроскопии для анализа полимерных объектов

	СЭМ	ПЭМ	ССМ
разрешение	нанометровое (сопоставимое)		
контрастирование	-	- / + (селективность)	- / +
экспрессность	+	+	-
дополнительный анализ	количественный (элементный, молекулярно-массовый,...)		качественный (упругость, адгезия...)
конформация макромолекул	на подложке	в растворе, на подложке	на подложке
внутренняя 3D структура	+ (срезы ФИП)	+ (проекции, ф. к., томография)	-
среда исследования	с.в. вакуум	с.в. вакуум	Жидкость, пары, Т, динамика

План доклада

- Общие принципы сканирующей зондовой микроскопии, сканирующая силовая микроскопия (ССМ)
 - Погрешности визуализации в ССМ
 - Информативность ССМ
 - Дополнительные аналитические возможности ССМ
 - Сопоставление ССМ и СТМ
- Методы оптической микроскопии
 - Флуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
 - Визуализация динамических процессов в реальном времени, 3D информация
 - Преимущества многофотонной схемы
 - STED микроскопия
 - Дифференциально-интерференционный контраст
- Сопоставление ССМ с методами электронной микроскопии
 - Возможности элементного анализа в ПЭМ
 - Типичные результаты СЭМ и ПЭМ при исследовании полимерных объектов, сопоставление с результатами ССМ
 - Анализ внутренней трехмерной структуры
 - Крио ПЭМ, новые возможности
- Нишевая применимость ССМ
 - Исследование динамики процессов на подложке

Транскрипция молекул ДНК : наблюдения в реальном времени



Транскрипция молекулы двуцепочечной ДНК молекулой РНК-полимеразы, наблюдения с помощью ССМ в водных средах.

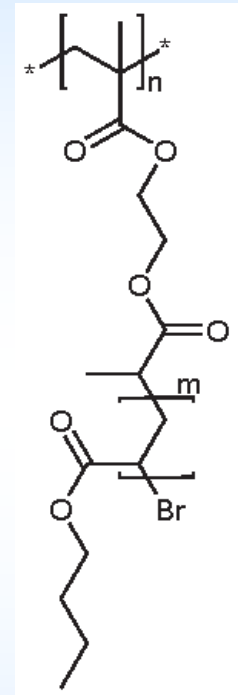
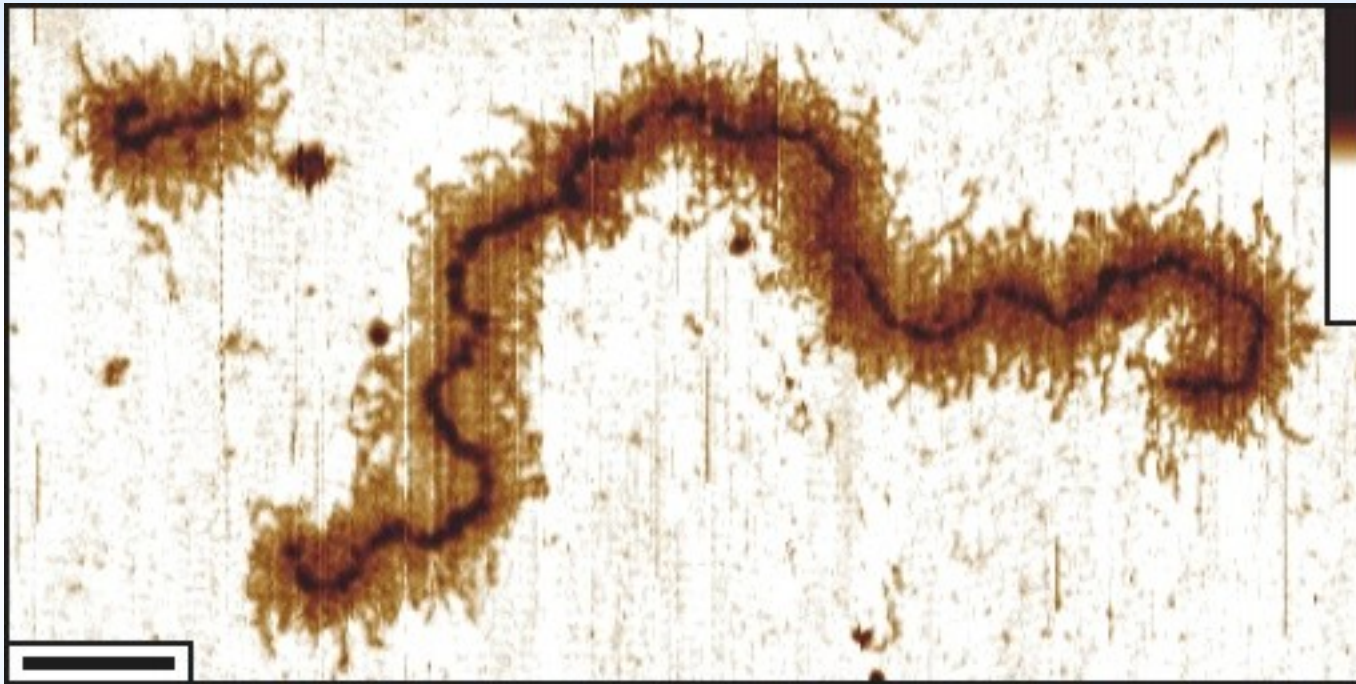
Исследования в парах: экспериментальная установка



- **PicoSPM**
(*Molecular Imaging*)

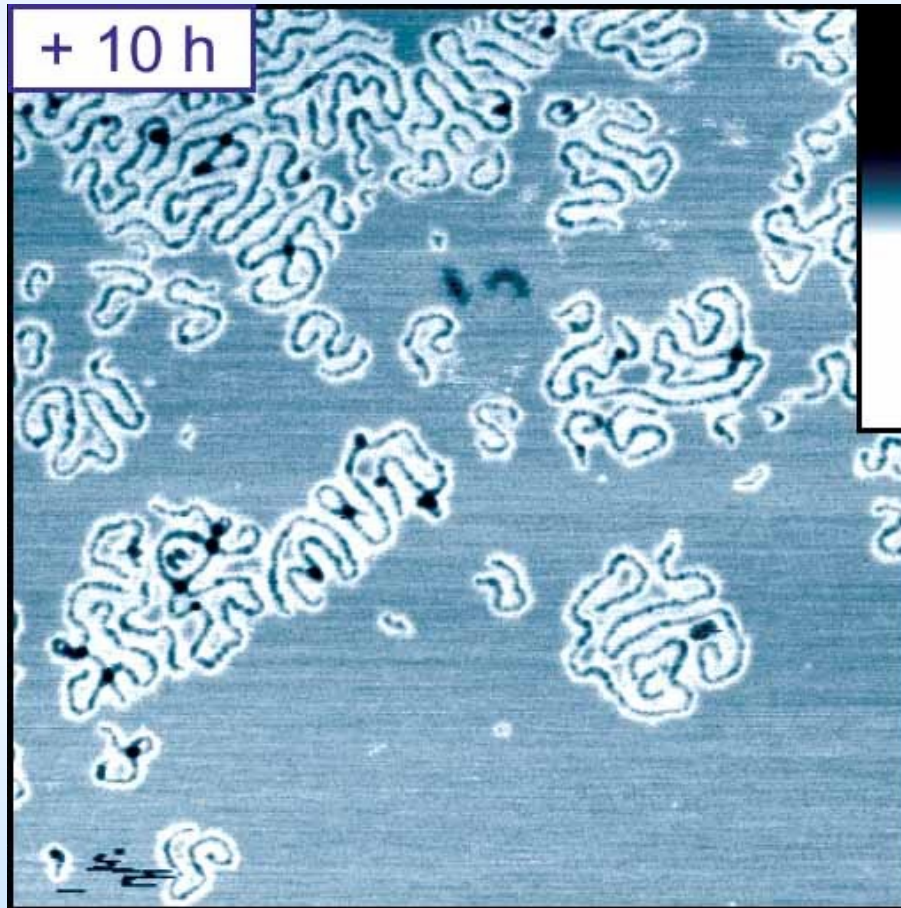
специальный дизайн
для ССМ
исследований в
режиме реального
времени *in situ* в
контролируемой
атмосфере (в **парах**
различной природы,
в атмосфере азота,
при контроле
влажности и т.п.)

Гребнеобразные макромолекулы на слюде



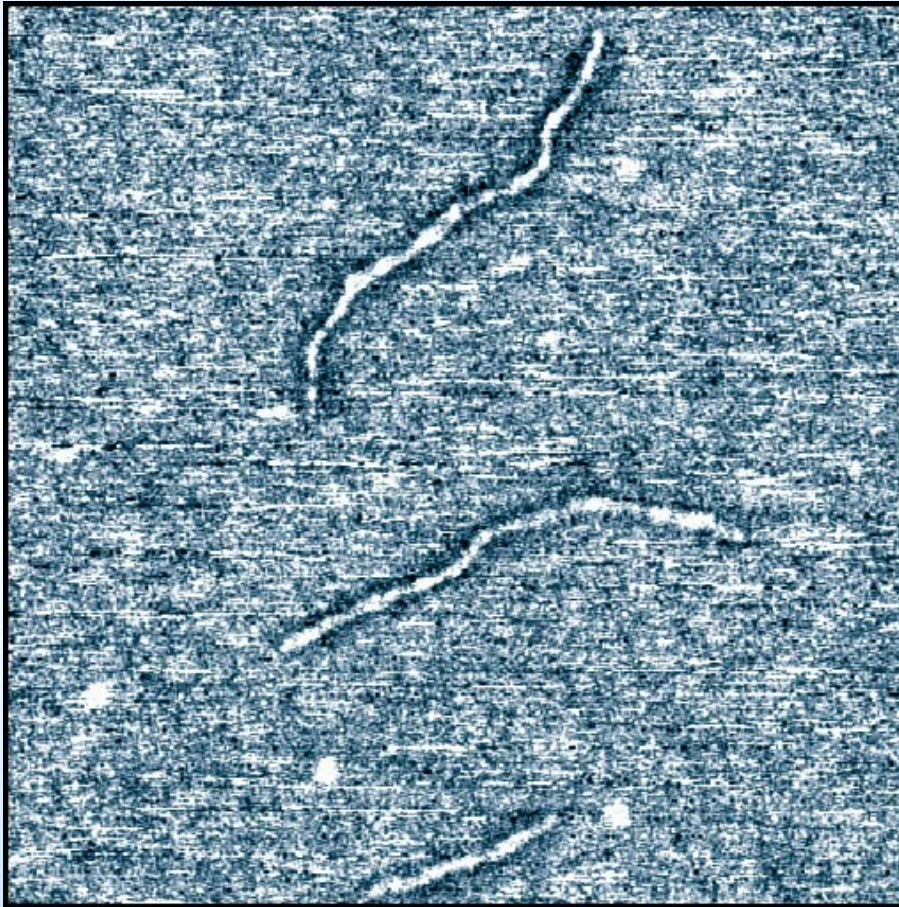
Гребнеобразные молекулы (**полимерные щетки**) ПМА-*g*-ПнБА синтезированы в группе проф. К. Матиашевского (Carnegie Mellon University, США) пришивкой *n*-бутилакрилатных боковых цепей к метакрилатному макроинициатору (ПБПЭМ). Нанесение из раствора в хлороформе на слюду по методу вращающейся подложки (spin-coating).
реперная черта: **50** нм, цветовая палитра: **5** нм

Динамика компактизации / разворачивания



- ***In situ* ССМ** в реальном времени
 - **слюда**
 - **Длинные щетки**
(основная цепь: 3700 DP, боковые цепи: 30 DP)
- размер кадра:**
2×2 мкм,
- шкала высот:**
10 нм

Динамика компактизации / разворачивания



- ***In situ* ССМ** в реальном времени
- **слюда**
- **Длинные щетки**
- Компактизация 80% раствором этанола (вод.)

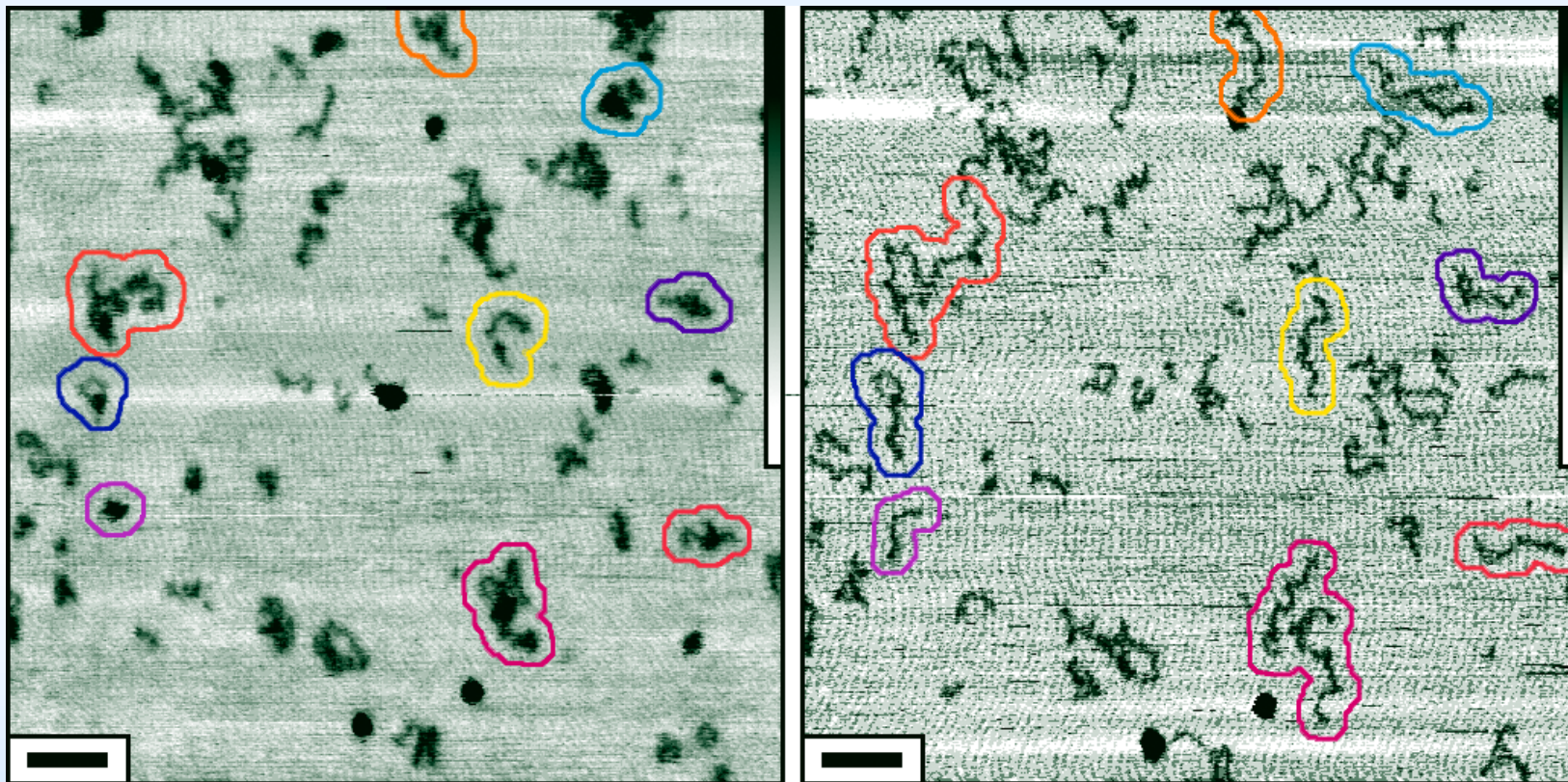
размер кадра:

1×1 мкм,

шкала высот:

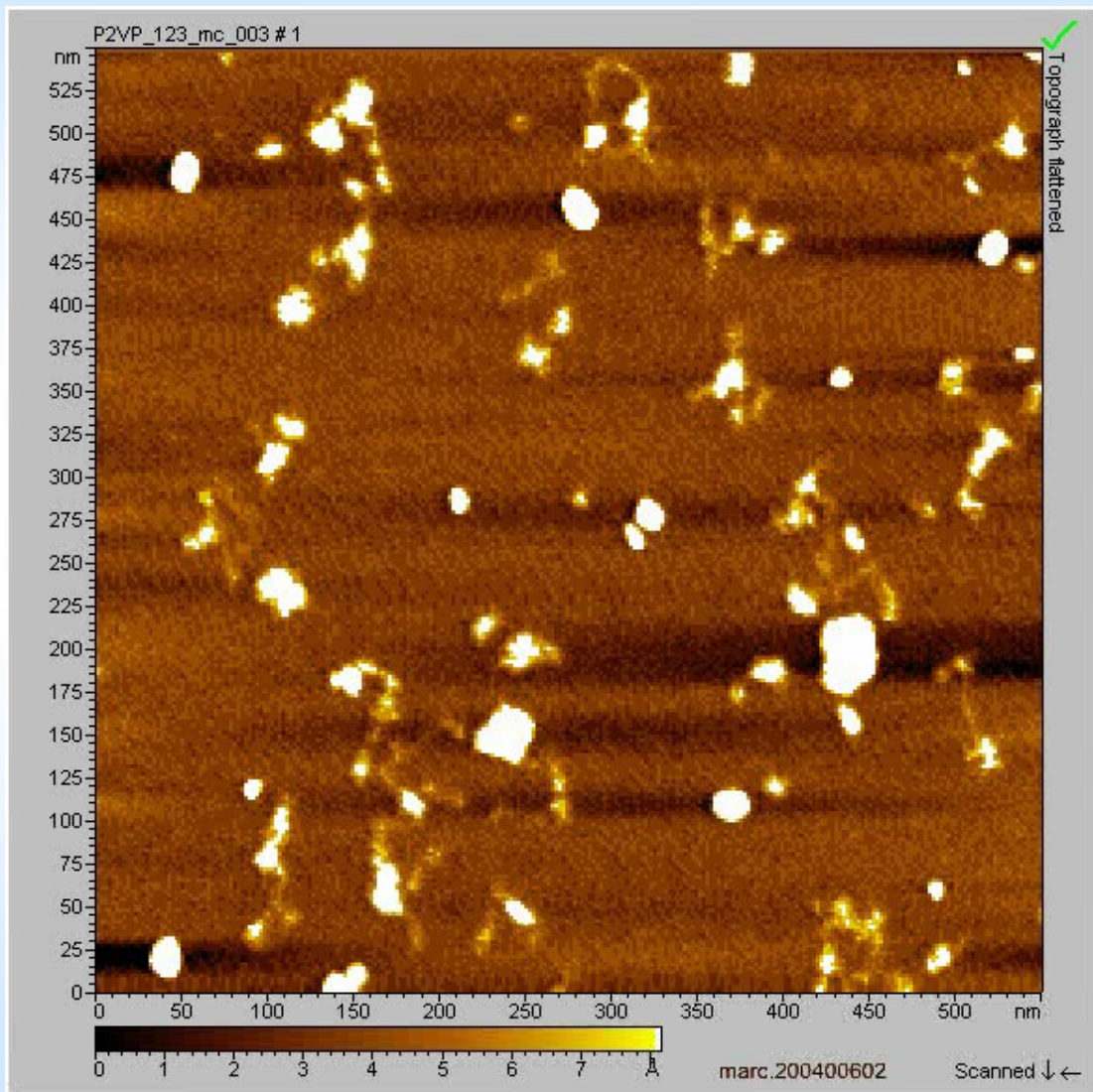
10 нм

Линейные цепи поли-2-винилпиридина на слюде



П2ВП (DP~1300), слева – как нанесено на слюду r.c. из CHCl_3 , справа – экспозиция в парах воды (часы). Размер черты: 100 нм, шкала высот: 1.2 нм (слева) и 0.5 нм (справа)

Динамика в парах воды и этанола



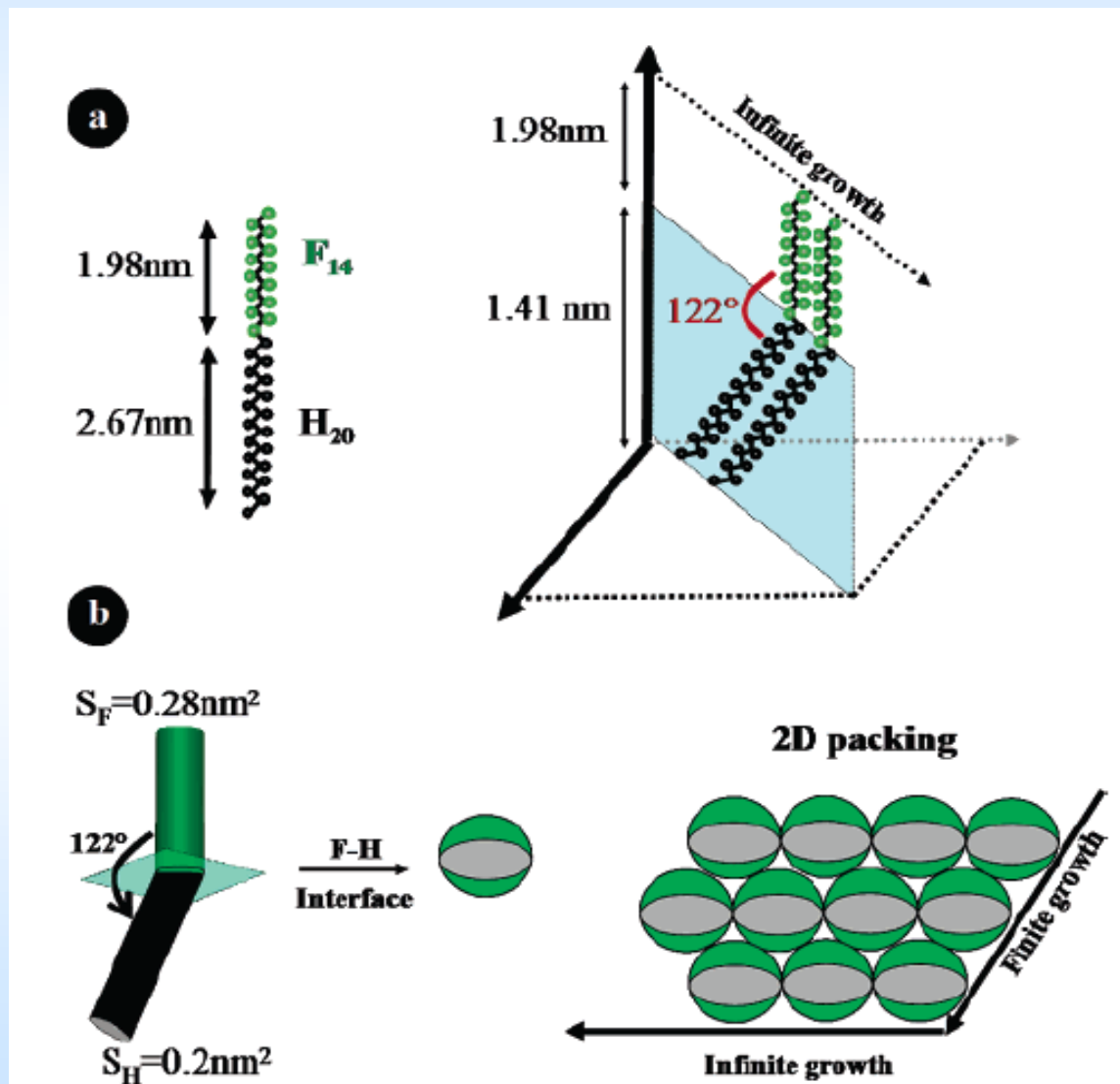
- *In situ* ССМ
- П2ВП на слюде
- Компактизация в парах **этанол**
- Разворачивание в парах **воды**

Размер кадра:

0.55 × 0.55 мкм,

Шкала : 0.7-4 нм

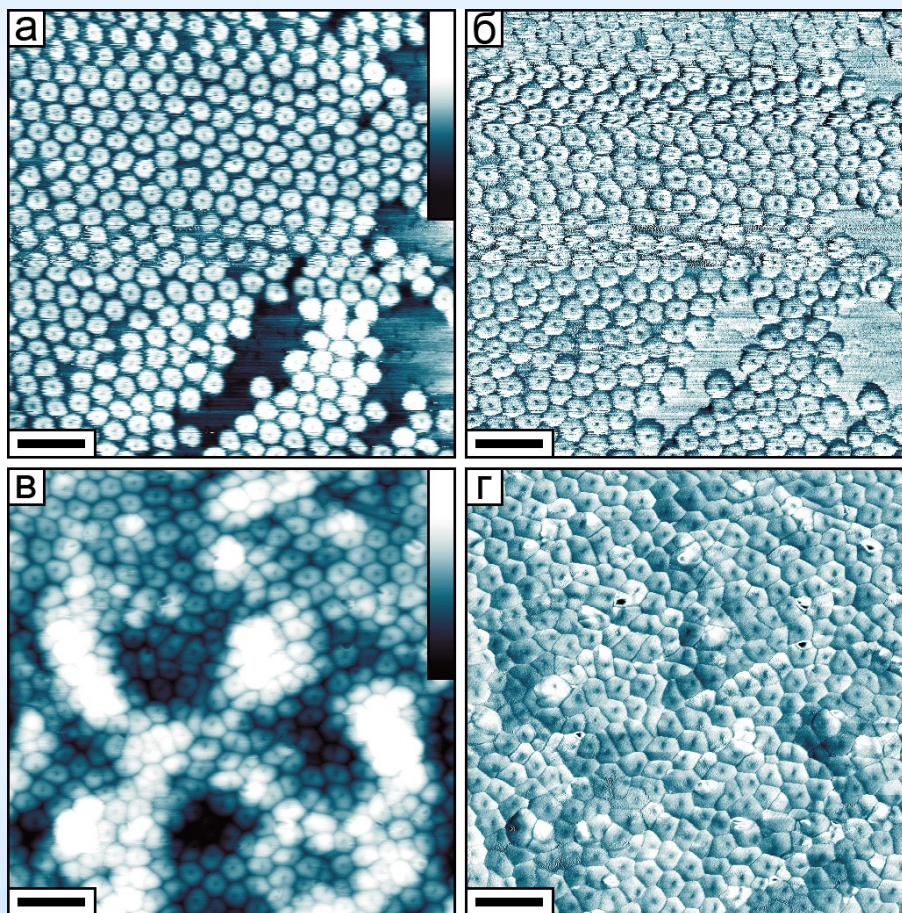
Самоорганизация F_nH_m молекул



Образцы
предоставлены
сотрудниками
группы проф. М.
Мёллера
(Университет
Ульма, Германия)

Данные ССМ: самоорганизация

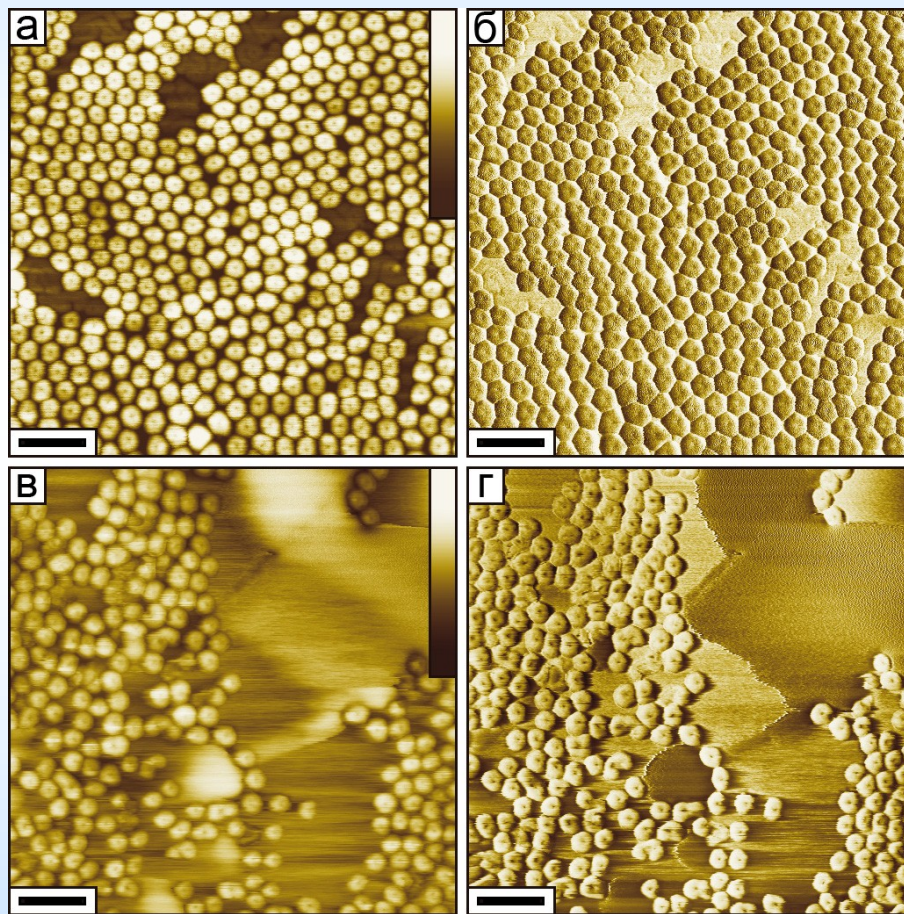
F_nH_m молекул



$F_{14}H_{18}$, слюда (a, б), графит (в, г), осаждение из раствора в сверхкритическом CO_2 , реперная черта: 150 нм, шкала высот: 10 нм (a), 20 нм (в)

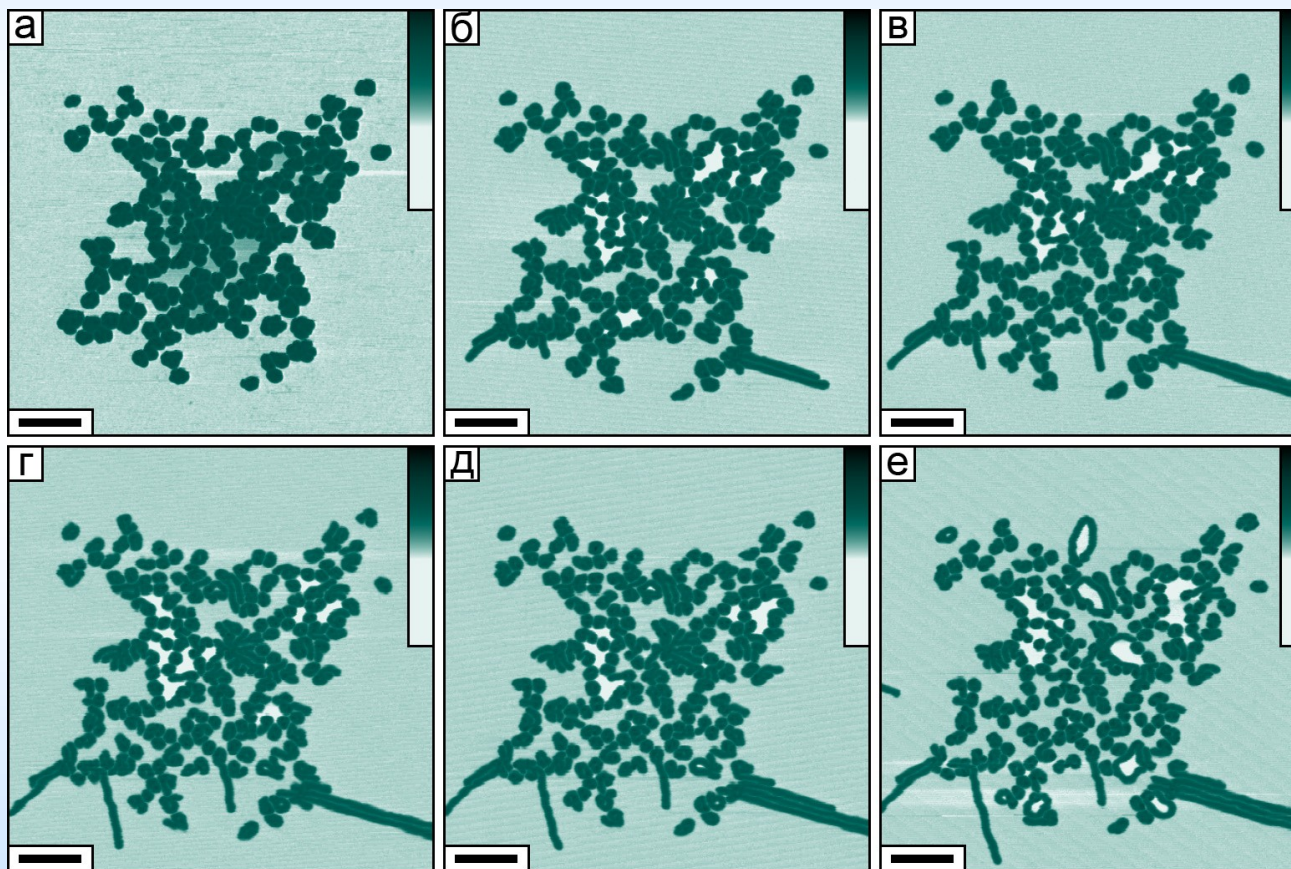
Данные ССМ: самоорганизация

F_nH_m молекул



$F_{12}H_{19}$, слюда (a, б), графит (в, г), осаждение из раствора в сверхкритическом CO_2 ,
реперная черта: 150 нм, шкала высот: 10 нм (a), 20 нм (в)

Динамика реорганизации в парах перфтордекалина

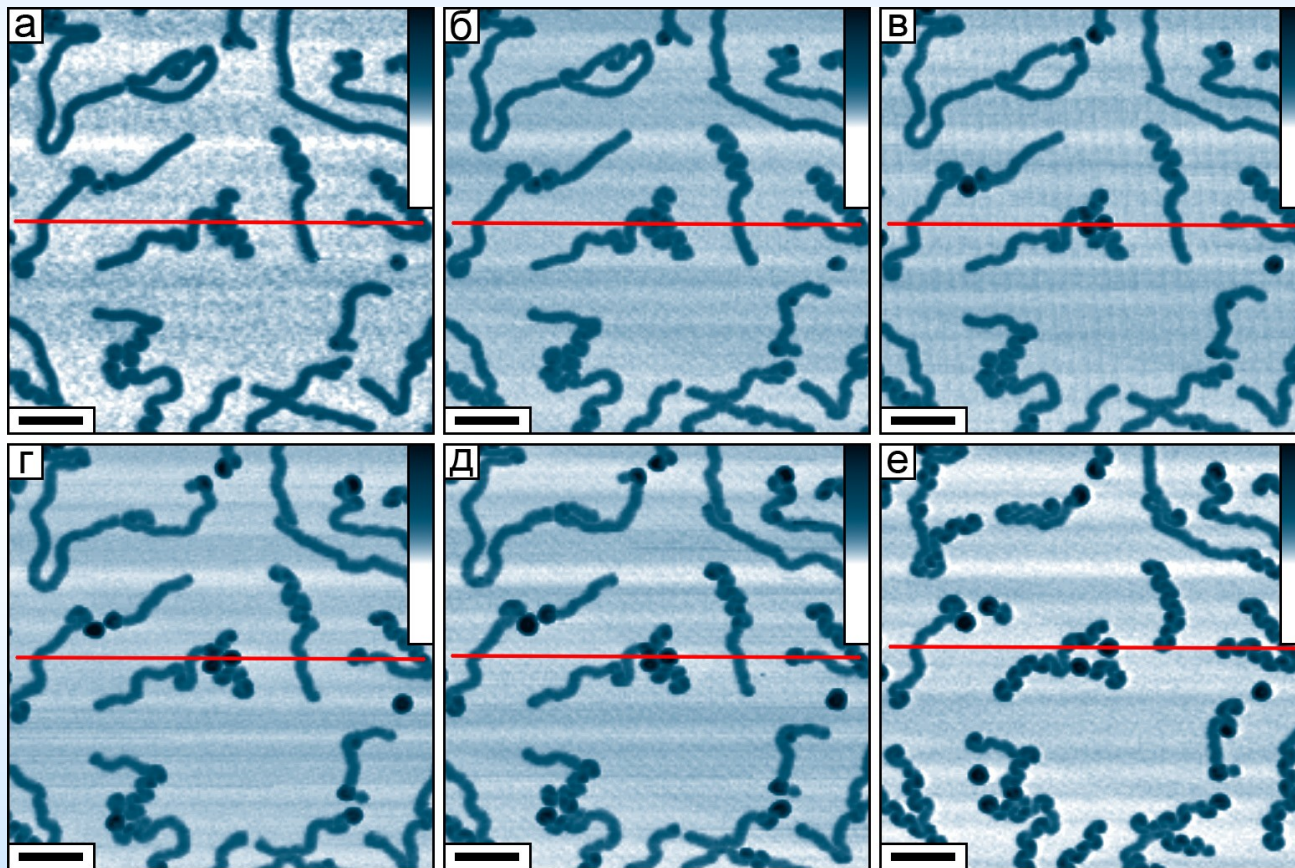


Осаждение из раствора в гексафторсилоле, экспозиция в парах перфтордекалина, реперная черта: 250 нм, шкала высот: 10 нм

Экспозиция в парах перфтордекалина

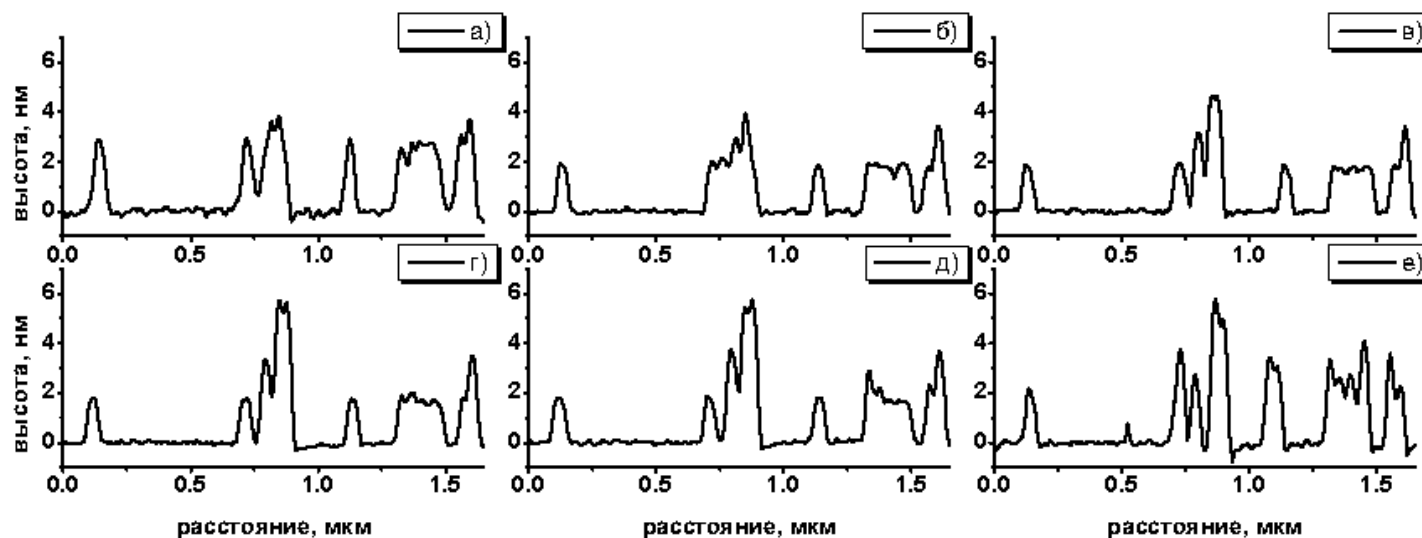
Экспозиция в парах перфтордекалина :		
A: 0 ч	B: 2.5 ч	C: 5 ч
D: 7.5 ч	E: 10 ч	F: 20 ч

Динамика реорганизации в парах гексафторсилола



Осаждение из раствора в декалине, экспозиция в парах гексафторксилола,
реперная черта: 250 нм, шкала высот: 10 нм

Динамика изменений профиля сечения организуемых структур



Экспозиция в парах гексафторсилола :

A: 0 ч

B: 2.5 ч

C: 5 ч

D: 7.5 ч

E: 10 ч

F: 20 ч

Заключение

- Принципиальным преимуществом ССМ является возможность исследования индуцированных процессов, протекающих на поверхности подложки с участием наноразмерных полимерных структур, в **режиме реального времени**.
- При этом, особенно важной является возможность **контроля** направленности индуцированного отклика вариацией параметров среды вокруг образца.