## Stanowisko Badawcze Skaningowy Mikroskop Pola Bliskiego (SNOM) w Zespole Badawczym Nanofotoniki IPPT PAN

Obsługa mikroskopu: mgr inż. Agata Roszkiewicz mgr inż. Witold Szabelak

Kierownik ZB Nanofotoniki: prof. dr hab. Wojciech Nasalski

#### INFORMACJE PODSTAWOWE

Na wyposażeniu Zespołu Badawczego Nanofotoniki znajduje się skaningowy mikroskop pola bliskiego: Scanning Near-field Optical Microscope alpha 300s firmy WITec. Ten zaawansowany system do nanowizualizacji pozwala na wykonywanie pomiarów w trzech trybach:

#### Mikroskopia konfokalna (Confocal Microscopy)

- transmisja, odbicie, jednoczesny pomiar transmisji i odbicia.

Mikroskopia konfokalna opiera się na podwyższeniu kontrastu obserwowanego obiektu dzięki zastosowaniu diafragmy blokującej pole optyczne dochodzące do płaszczyzny obrazowej z płaszczyzn leżących na innej głębokości niż płaszczyzna przedmiotowa badanego obiektu. Zdolność rozdzielcza systemu optycznego nadal jest jednak ograniczona długością fali pola optycznego.

#### Mikroskopia sił atomowych (Atomic Force Microscopy)

- contact mode, tapping mode.

Mikroskopia sił atomowych bazuje na oddziaływaniu pomiędzy atomami sondy a atomami próbki, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie topografii powierzchni wraz z charakterystyką sił działających między sondą a obiektem. Rozdzielczość AFM ograniczona jest przez średnicę ostrza sondy.

<u>Skaningowa mikroskopia pola bliskiego</u> (Scanning Near-field Optical Microscopy)

- contact mode, tapping mode, collection mode.

Skaningowa mikroskopia pola bliskiego pozwala na pomiar rozkładu pola elektromagnetycznego w otoczeniu obiektu. Dzięki temu można uzyskać informację o współczynnikach optycznych charakteryzujących oddziaływanie pola elektromagnetycznego z próbką, np. współczynnik załamania czy impedancję ośrodka. Dzięki zastosowaniu apertury o średnicy kilkudziesięciu nanometrów możliwe jest zwiększenie rozdzielczości wizualizowanego obiektu umieszczonego w polu bliskim.

#### Przykłady niekonwencjonalnych zastosowań systemu optycznego SNOM



FIG. 1. Scheme of the configuration. A dielectric sphere (radius 10 nm) on a flat dielectric surface is illuminated under total internal reflection. A tungsten probe is used to create an optical trap.

[3] (Chaumet et al., 2002)

(a) (x,y) (c) (c) (d) (c) (d) (d)

FIG. 2. (color online). (a) Harmonic potential well  $U(x, y) = \frac{k}{2}(x^2 + y^2)$  (*k* is the restoring force constant or stiffness of the harmonic oscillator) with a Brownian particle inside and with an external torque acting on the particle.

[4] (Volpe and Petrov, 2006)

#### Pułapkowanie nanocząsteczek

Badania nad pułapkowaniem i manipulacją nanocząsteczkami przy użyciu metalowej sondy działającej w obecności pola optycznego podjęto już pod koniec ubiegłego wieku [1] (Nowotny et al., 1997), [2] (Okamoto and Kawata, 1999). Badania teoretyczne i numeryczne wykazały możliwość wydatnego wzmocnienia pola w otoczeniu sondy, prowadzące do powstania potencjału wystarczająco głębokiego, by przezwyciężyć ruchy Browna nanocząsteczek i do ich pułapkowania w okolicach końcówki sondy. Dalsze prace, jeszcze wtedy oparte na analizie teoretycznej i symulacjach numerycznych [3] (np. Chaumet et al., 2002), wykazały, że tego typu pułapkowanie może być realizowane również w powietrzu albo w próżni, przy jednoczesnej lokalizacji i selekcji nanocząsteczek w pobliżu powierzchni dielektrycznego podłoża. Położenie dielektrycznej nanocząsteczki (szkło,  $\epsilon \approx 2.25$ ), o wymiarach rzędu dziesiątek nanometrów, ustalane jest poprzez jednoczesne oddziaływanie pola zanikającego w kierunku od dielektrycznego podłoża, jak i pola rozpraszanego na końcówce metalowej sondy. Schemat konfiguracji rozpatrywanego układu optycznego przedstawiony jest na Rys. 1 [3].

Pole zanikające generowane jest przez padające symetrycznie od strony podłoża dwie fale płaskie pod kątami spełniającymi warunek całkowitego wewnętrznego odbicia (TIR). Położenie równowagi nanocząsteczki w płaszczyźnie poziomej ustalane jest przez położenie sondy w poziomie, a w płaszczyźnie pionowej poprzez odpowiednią odległość sondy od podłoża (rzędu 10-30 nm), kąt padania fal płaskich (rzędu 40°-50°), ich polaryzację (TE lub TM) i własności materiałowe sondy (wolfram lub srebro). Możliwe jest selektywne, ze względu na wielkość i położenie nanocząsteczki, jej pułapkowanie i w konsekwencji wychwytywanie i przemieszczanie pojedynczej nanocząsteczki ze zbioru wielu nanocząsteczek. Istotne w tych nanomanipulacjach jest to, że zwrot poszczególnych składowych sił działających na nanocząsteczki może zmieniać znak przy zmianie polaryzacji pola z TE na TM, jak również przy zmianie materiału sondy (wolfram, srebro). Co więcej, wskazano, że bogactwo możliwości manipulacyjnych takiego układu powinno wydatnie wzrosnąć przy zastąpieniu fal płaskich wiązkami światła o skończonym przekroju i niejednorodnym rozkładzie amplitudy, fazy i polaryzacji pola.

#### Manipulacja nanocząstkami

Używane w pomiarach wiązki światła mają zazwyczaj standardową postać podstawowej wiązki Gaussa o polaryzacji liniowej. Łącznie z falami zanikającymi – powierzchniowymi lub wyciekającymi – generowanymi na granicy podłoża, wiązki Gaussa zapewniają pułapkowanie nanocząsteczek poprzez powstające siły promieniowania, związane z przekazywaniem nanocząsteczkom części pędu pola wiązek. Jednakże w przypadku, gdy wiązka Gaussa posiada polaryzację kołową lub eliptyczną, może ona przekazywać nanocząsteczce również część swojego momentu pędu (AM), w tym przypadku spinowego momentu pędu (SAM). Co więcej, gdy wiązkę Gaussa zastąpimy wiązką Laguerra-Gaussa (LG) wyższego rzędu o dowolnej polaryzacji, taka wiązka może przekazywać nanocząsteczce również orbitalny moment pędu (OAM). Zarówno spinowy jak i orbitalny momenty pędu pozwalają wprowadzić pułapkowaną nanocząsteczkę w ruch obrotowy względem jej osi, jak i względem osi wiązki, co w sposób istotny wzbogaca możliwości manipulacji nanocząsteczkami. Pułapkowanie nanocząsteczki wraz z jednoczesnym oddziaływaniem na nią momentem obrotowym generowanym przez wiązkę LG opisane zostało np. w pracy [4] (Volpe and Petrov, 2006) i przedstawione na Rys. 2.

Pierwsza wiązka – wiązka Gaussa (785 nm) ogniskowana przez obiektyw (100x1.3NA) - tworzy harmoniczny potencjał poprzez siły gradientowe oddziaływujące na zawiesinę nanocząsteczek (o promieniu rzędu 500 nm). Pole rozproszone odprowadzane jest poprzez drugi obiektyw i rejestrowane przez fotodiodę. Parametry pułapkowania ustalane są głównie poprzez natężenie wiązki. Druga wiązka – wiązka LG o polaryzacji liniowej i indeksie azymutalnym I=10, przekazuje nanocząsteczce moment obrotowy (rzędu 10<sup>-20</sup> Nm), wprawiając ją w ruch obrotowy względem osi wiązki LG. Przy wyłączonej pierwszej wiązce, nanocząsteczka pułapkowana jest przez wiązkę LG w pierścieniu o największym natężeniu pola i krąży po tym pierścieniu wokół osi wiązki . Przy włączonej pierwszej wiązce, o dużo większym natężeniu niż natężenie wiązki drugiej, nanocząsteczka pułapkowana jest w osi wiązki pierwszej i obraca się wokół własnej osi. W obu przypadkach kierunek obrotu zależy od znaku ładunku topologicznego wiązki LG (±10). Tak więc przełączając obie wiązki pola optycznego i zmieniając ich polaryzację, zmieniamy jednocześnie zarówno położenie nanocząsteczki jak i charakerystykę jej ruchu obrotowego.

#### Zastosowania pomiarów SNOM w biowizualizacji

Skaningowa mikroskopia pola bliskiego pozwala na jednoczesne pomiary optyczne nanoobiektów w polu bliskim (np. fluorescencji) i topografii ich powierzchni z dokładnością rozdzielczą obrazu rzędu nanometrów. Łączy w sobie cechy właściwe dla mikroskopii optycznej z zaletami nieoptycznych technik o wysokiej rozdzielczości (AFM). W naukach biologicznych ta cecha jest szczególnie przydatna podczas obserwacji zjawisk zachodzących w organizacji błon komórkowych, związanych np. z raftami lipidowymi czy oddziaływaniami pomiędzy różnymi rodzajami białek [5].

Jednoczesny pomiar fluorescencji w trybie SNOM oraz topografii pozwala np. na uzyskanie precyzyjnych informacji o różnych fazach występujących w tłuszczowych monowarstwach [5]. Obszary faz o różnych stopniach uporządkowania są rozróżnialne zarówno w obrazie fluorescencyjnym jak i topograficznym pomimo faktu, że różnica wysokości położenia obu faz jest rzędu 0.5-0.8nm. Te pomiary potwierdzają użyteczność jednoczesnego pomiaru SNOM i topografii i pokazują, że pomiary o wysokiej rozdzielczości, uzyskane dzięki mikroskopii pola optycznego pozwalają na detekcję i rozróżnienie małych obszarów, występujących np. w raftach lipidowych.



[5] (Dickenson et al., 2010)

Rys.3. Pomiary SNOM wysokiej rozdzielczości: a) fluorescencja i b) topografia monowarstwy DPPC na podłożu z miki. Jasne regiony na obrazie fluorescencyjnym oznaczają fazę cieczy rozprężonej (LE) i odpowiadają niższym obszarom na obrazie topograficznym. Obszary cieczy skondensowanej (LC) o niskiej fluorescencji odpowiadają wyższym obszarom na obrazie topografii.

Ze względu na fakt, że, w przeciwieństwie do pomiarów w polu dalekim, rozdzielczość przestrzenna SNOM nie zależy od długości fali pobudzającej, technika ta daje możliwość redukcji tła autofluorescencji często występującej w próbkach biologicznych bez zmniejszania rozdzielczości pomiaru. Rys. 4. przedstawia pomiary fluorescencji w polu dalekim, pomiar w trybie SNOM oraz zebraną jednocześnie informację o topografii komórki mięśnia gładkiego tętnicy ludzkiej z oznakowaną aktyną-F [6]. Widać wyraźną korelację pomiędzy filamentami aktynowymi w obrazie fluorescencyjnym SNOM i w topografii. Pomiary mogą być prowadzone zarówno w powietrzu - jak w tym przypadku - jak również w środowisku wodnym.



[6] (Hollars and Dunn, 1998)

Rys.4.

a) Fluorescencja w polu dalekim komórki mięśnia gładkiego tętnicy ludzkiej.

b) Fluorescencja w trybie SNOM zaznaczonego regionu.

c) Jednoczesny pomiar topografii próbki w trybie SNOM.

Najmniejsze obiekty widoczne w polu dalekim mają w przybliżeniu wymiary 350nm. Natomiast wymiary najmniejszych obiektów rozróżnialnych na Rys.2b są rzędu 75nm, co odzwierciedla średnicę apertury użytej w doświadczeniu.

#### Literatura:

- [1] L. Nowotny, R. X. Bian and X. S. Xie, Phys. Rev. Lett. 79, 645-648 (1997).
- [2] K. Okamoto and S. Kawata, Phys. Rev. Lett. 83, 4534-4537 (1999).
- [3] P. C. Chaumet, A. Rahmani, and M. Nieto-Vesperinas, Phys. Rev. Lett. 88, 123601 (2002).
- [4] G. Volpe and D. Petrov, Phys. Rev. Lett. 97, 210603 (2006).
- [5] N. E. Dickenson, K. P. Armendariz, H. A. Huckabay, P. W. Livanec, R. C. Dunn, Anal. Bioanal. Chem. 396, 31 (2010)
- [6] C. Hollars, R. C. Dunn, Biophys. J. 75, 342 (1998)

#### PRZYKŁADY WIZUALIZACJI NANOSTRUKTUR

przeprowadzonych na stanowisku badawczym Skaningowy Mikroskop Pola Bliskiego (SNOM) w Zespole Badawczym Nanofotoniki IPPT PAN

instalacja systemu: styczeń - kwiecień 2010 pomiary: maj - październik 2010

# Struktura do prowadzenia plazmonów polarytonów powierzchniowych (SNOM mode)



reflection



transmission



AFM picture



transmission (scaled)

Tryb pracy mikroskopu: SNOM, jednoczesny pomiar pola odbitego i transmitowanego. Dodatkowo topografia próbki – lewy dolny obrazek.

## Polimery, kropelki wraz ze strugami (Confocal mode)



Tryb pracy mikroskopu: Confocal. Próbka polimeru otrzymana z zakładu Mechaniki i Fizyki Płynów (dr Tomasz Kowalczyk).

## Wyeksploatowany filtr powietrza, Warszawa (Confocal mode)



# Hydroksyapatyt, substrat Ti-6AI-4V



Confocal reflection



AFM contact



SNOM reflection



#### SNOM Topography

Różne tryby pracy mikroskopu. Próbka wyprodukowana w Zakładzie Wytrzymałości Materiałów, w pracowni Technologicznych Zastosowań Laserów (prof. Zygmunt Szymański).

## Stanowisko Badawcze Skaningowy Mikroskop Pola Bliskiego (SNOM) w Zespole Badawczym Nanofotoniki IPPT PAN

- 1. Nanowizualizacja włókien polimerowych przędzonych w Pracowni Fizyki Polimerów ZTOC IPPT PAN.
  - 2. Nanowizualizacja elementów mikroelektroniki zintegrowanej otrzymanej z firmy VIGO System S.A.

3. Nanowizualizacja komórek śródbłonka myszy otrzymanej z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz z Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków.

Pomiary: czerwiec 2012

Obsługa mikroskopu: dr inż. Agata Roszkiewicz

Kierownik ZB Nanofotoniki: prof. dr hab. Wojciech Nasalski

## Włókna polimerowe



Tryb pracy mikroskopu: Confocal Transmission

Włókna polimerowe przędzone w Pracowni Fizyki Polimerów w Zakładzie Teorii Ośrodków Ciągłych IPPT PAN

Warunki przędzenia: PLC 22.5% Ge: 2% 200µl/h



Mikroelementy złote

Złoto na powierzchni CdTe



Granica złota na podłożu CdTe

Powierzchnia CdTe

Tryb pracy mikroskopu: Confocal reflection Próbka otrzymana z firmy VIGO System S.A. Wizualizacja powierzchni tellurku kadmu i złota.

Obraz dużej powierzchni złożony z 16 ekspozycji



Złoty krzyż centrujący

40 µm

Mikroskop konfokalny, tryb odbicia







Tryb pracy mikroskopu: Confocal reflection Próbka otrzymana z firmy VIGO System S.A. Wizualizacja powierzchni oraz granicy tellurku kadmu.

llość zliczeń z fotopowielacza

Topografia



Tryb pracy mikroskopu: SNOM reflection Próbka otrzymana z firmy VIGO System S.A. Wizualizacja powierzchni tellurku kadmu.

llość zliczeń z fotopowielacza

Topografia





Tryb pracy mikroskopu: SNOM reflection Próbka otrzymana z firmy VIGO System S.A. Wizualizacja powierzchni oraz granicy tellurku kadmu.

llość zliczeń z fotopowielacza

Topografia





Tryb pracy mikroskopu: SNOM reflection Próbka otrzymana z firmy VIGO System S.A. Wizualizacja powierzchni oraz granicy tellurku kadmu i złota.

#### Nanowizualizacja komórek śródbłonka myszy

llość zliczeń z fotopowielacza

Topografia



Tryb pracy mikroskopu: SNOM Transmission Unieśmiertelnione komórki śródbłonka myszy. Linia komórkowa EAHY 294 Utrwalone w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS

### Nanowizualizacja komórek śródbłonka myszy

llość zliczeń z fotopowielacza

Topografia



Tryb pracy mikroskopu: SNOM Transmission

Unieśmiertelnione komórki śródbłonka myszy, jądro komórkowe.

Linia komórkowa EAHY 294

Utrwalone w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS

## Nanowizualizacja komórek śródbłonka myszy oraz PBS

llość zliczeń z fotopowielacza

Topografia



Tryb pracy mikroskopu: SNOM Transmission

Unieśmiertelnione komórki śródbłonka myszy, kryształki PBS.

Linia komórkowa EAHY 294

Utrwalone w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS

### Nanowizualizacja komórek śródbłonka myszy

llość zliczeń z fotopowielacza

Topografia



Tryb pracy mikroskopu: SNOM Transmission Unieśmiertelnione komórki śródbłonka myszy. Linia komórkowa EAHY 294 Utrwalone w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS

Ten sam obszar bez filtra (górne) i z filtrem 550nm (dolne).

## Stanowisko Badawcze Skaningowy Mikroskop Pola Bliskiego (SNOM) w Zespole Badawczym Nanofotoniki IPPT PAN

Pomiary: 26.09.2013.

Nanowizualizacja próbki grafitu otrzymanej z Zakładu Wytrzymałości Materiałów IPPT PAN (prof. Zygmunt Szymański)

> Obsługa mikroskopu: dr inż. Agata Roszkiewicz-Walczuk

Kierownik ZB Nanofotoniki: prof. dr hab. Wojciech Nasalski

#### Wizualizacja zagłębienia F na próbce.



Mikroskop konfokalny. Zagłębienie F. Obszar niewiele większy niż na porźszym wykresie.



Tryb pracy mikroskopu: Confocal Reflection. Ilość zliczeń z fotopowielacza, cały obszar zagłębienia. Wykres obejmuje obszar minimalnie mniejszy niż przedstawiony na poprzednim zdjeciu



Mikroskop konfokalny. Powierzchnia próbki poza zagłębieniami.



Tryb pracy mikroskopu: AFM. Trzy niewielkie fragmenty w centrum zagłębienia. Wykresy po lewej odpowiadają topografii zmierzonej podczas ruchu sondy w prawo. Wykresy po prawej odpowiadają topografii zmierzonej podczas ruchu sondy w lewo. Maksymalne zmierzone różnice wysokości między skrajnymi punktami: 2.3 um (I rząd), 2.75um (II rząd) oraz 1.9 um (III rząd).



Tryb pracy mikroskopu: AFM. Obszar obejmuje całe zagłębienie wraz z fragmentem powierzchni dookoła (jak na wykresie 2).

Maksymalne zmierzone różnice wysokości między skrajnymi punktami: 2.5 um.

## Stanowisko Badawcze Skaningowy Mikroskop Pola Bliskiego (SNOM) w Zespole Badawczym Nanofotoniki IPPT PAN

Pomiary: listopad 2013

## Nanowizualizacja próbek polimerów otrzymanych z Zakładu Mechaniki i Fizyki Płynów IPPT PAN (dr Tomasz Kowalczyk)

Tryb pracy mikroskopu: Confocal Reflection. Ilość zliczeń z fotopowielacza.

Obsługa mikroskopu: dr inż. Agata Roszkiewicz-Walczuk

Kierownik ZB Nanofotoniki: prof. dr hab. Wojciech Nasalski











CG 44: PLLA









<u>CG 44: PLLA</u>

## CG 56: PLLA + 5% POSS



0.8 µm

1.4

1.6

1.2

0.2

0.4

0.6

0.8 µm

1.2

1.4

0.6

0.2

0.4



## CG 56: PLLA + 5% POSS





## CG 56: PLLA + 5% POSS





