慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	倒立型微分干渉顕微鏡に搭載した原子力間力顕微鏡を精度100nmで位置制御しスライドガラス上の生物試料を観察するためのステージ
Sub Title	Mounting a standalone AFM head on an inverted DIC microscope stage with X-Y positional control at 100-nanometer precision for imaging biological samples deposited on glass slides
Author	古野, 泰二(Furuno, Taiji)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2004
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 No.36 (2004. 9) ,p.57- 62
JaLC DOI	
Abstract	The atomic force microscope (AFM) has proved to be a useful tool to obtain geometrical information of the surface of objects at better than nanometer spatial resolution. When imaging by AFM the micron-sized biological objects deposited on a transparent substrate such as glass coverslip, we encounter the problem that the cantilever tip must be positioned over that transparent object with sub-micrometer positional control. It is quite difficult to visualize that transparent object with the optical microscope built in or externally linked to the AFM head. In this study a stand-alone-type AFM head was mounted on an inverted Nomarski/DIC optical microscope, which allowed transparent objects to be imaged together with the tip almost contacting the specimen surface. An X-Y stage, that can control the specimen position with X-and Y-pulse motors at 100-nm precision with respect to the cantilever tip, was integrated into this inverted microscope. The position of the cantilever tip, which is seen in the objective field of the optical microscope, is adjustable in both X-and Y-directions manually with micrometer screws independent of the specimen X-Y stage. This stage setting allowed high resolution imaging, e. g., of a sample of two dimensional protein arrays prepared on the surface of a glass coverslip, indicating that our AFM/Nomarski system enables simultaneous imaging at both micro-and nanometer spatial resolutions.
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20040930-0057

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Hiyoshi Review of Natural Science
Keio University No. 36, 57-62（2004）

倒立型微分干渉顕微鏡に搭載した原子間力顕微鏡を精度100nmで位置制御しスライドガラス上の生物試料を観察するためのステージ

古　野　泰　二

Mounting a Standalone AFM Head on an Inverted DIC Microscope Stage with X-Y Positional Control at 100-nanometer Precision for Imaging Biological Samples Deposited on Glass Slides

Taiji FURUNO

The atomic force microscope（AFM）has proved to be a useful tool to obtain geometrical information of the surface of objects at better than nanometer spatial resolution. When imaging by AFM the micron-sized biological objects deposited on a transparent substrate such as glass coverslip, we encounter the problem that the cantilever tip must be positioned over that transparent object with sub-micrometer positional control. It is quite difficult to visualize that transparent object with the optical microscope built in or externally linked to the AFM head. In this study a stand-alone-type AFM head was mounted on an inverted Nomarski/DIC optical microscope, which allowed transparent objects to be imaged together with the tip almost contacting the specimen surface. An X-Y stage, that can control the specimen position with X-and Y-pulse motors at 100-nm precision with respect to the cantilever tip, was integrated into this inverted microscope. The position of the cantilever tip, which is seen in the objective field of the optical microscope, is adjustable in both X-and Y-directions manually with micrometer screws independent of the specimen X-Y stage. This stage setting allowed high resolution imaging, e. g., of a sample of two dimensional protein arrays prepared on the surface of a glass coverslip, indicating that our AFM/Nomarski system enables simultaneous imaging at both micro-and nanometer spatial resolutions.

†慶應義塾大学医学部物理学教室（〒223-8521　横浜市港北区日吉４－１－１）
Dept. of Phys., Keio Univ. School of Medicine, Hiyoshi Campus,
４－１－１ Hiyoshi, Kohoku-ku Yokohama, Kanagawa 223-8521, Japan
e-mail：furuno@hc.cc.keio.ac.jp

研究背景

20年程前に発明された原子間力顕微鏡（AFM）は，トンネル顕微鏡に代表される走査プローブ顕微鏡の一員として，絶縁性試料の幾何学的表面構造をナノメータもしくはそれより高い分解能で解析する際に必須の装置となった。生体分子の構造解析，特に，表面の凹凸が１ナノメータ以下の膜タンパク質２次元結晶のイメージングにおいては極めて有効な構造解析手段であることが証明された。逆にいえば，生体試料表面の凹凸が大きくなるにつれイメージングの困難さが増すことを意味しており，特に，単独の１分子をイメージするのは，現在でも極めて困難である。また，生体分子や生体分子集合体のイメージングにおいては，試料を載せる基板もできるだけ平滑な必要があり，できれば原子レベルで平滑な表面が望ましく，これまで標準的に使用され高い実績をもつのはマイカ（雲母）である。シリコンウエハやカバーガラス表面なども表面粗さは１～２nm程度と比較的平滑であるが，対象とする生体分子の大きさ（高さ）が～10nmであることを考えると十分平滑とはいえない。しかしながら，細胞生物学，プロテインチップ，１分子計測など，これまで光学顕微鏡，特に蛍光顕微鏡が活躍してきた分野でAFMを使用するのであれば，ガラス基板を使いこなす必要がある。

そこで，ミクロンサイズの透明物体を光学顕微鏡観察しながら，AFMティップをサブミクロン精度で物体の目標位置にアプローチすることが可能な倒立顕微鏡用AFMステージを製作することにした。ステージの振動や熱ドリフト存在下でのAFMの性能評価として，タンパク質２次元集合体のイメージングを試みた。

ステージとAFMヘッド

使用したAFM（Explorer，Topometrix社）は試料形状に対する制限が緩く，ヘッドの下面から出る３本の脚（間隔数cm）を支点として，平坦な試料をそのほぼ中心に置くように配置してイメージングするタイプのものである（図１）。したがって，原則的には倒立顕微鏡のステージにそのまま搭載可能である。

AFMイメージングの実験では，カンチレバーを半月形の小さな鉄板に接着し，これを磁力でピエゾスキャナに固定する。交換の度にティップ先端位置は容易に100μm程度ずれることになる。したがって，AFMヘッドの据え付け位置は固定ではなく，光学顕微鏡に対して可変とする必要がある。このため，倒立光学顕微鏡に取り付けるステージはAFMヘッド移動用と試料移動用の２組を組み合わせることになる。ティップ位置はマニュアル操作によって２～３μmの精度で制御できればよい。そうすれば，光学顕微鏡視野内の目標位置（通常は中心付近）にティップを持ってくることは容易である。このような理由から，AFMヘッドを手動式のXYステージに載せ，試料の方をサブミクロン精度で位置制御可能なパルスモーターXYステージに載せることにした。これにより，試料に対するティップのXY位置，すなわち，AFMイメー

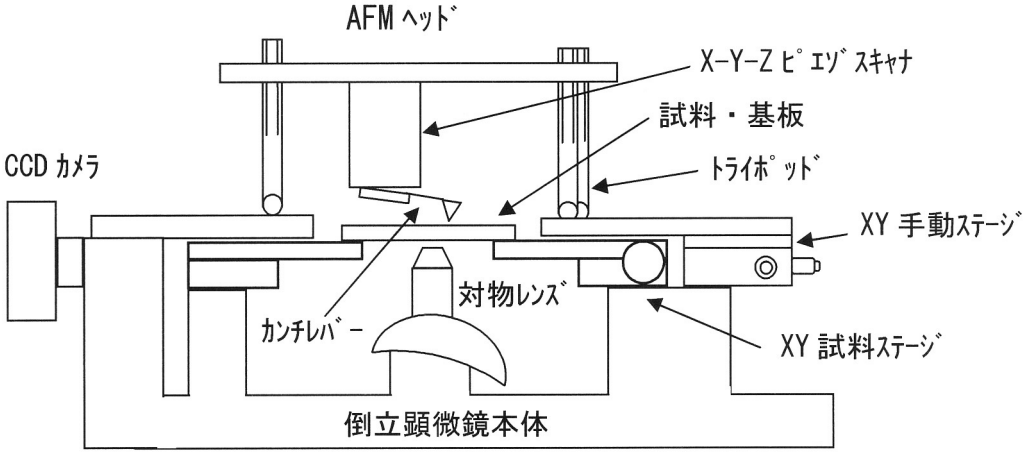

Fig.1
Schematic representation of the inverted Nomarski microscope equipped with a high precision specimen XY stage combined with a manually controlled XY stage for mounting an AFM head.

ジングの領域をサブミクロン精度で指定することができる。

システムの模式図を図1に示す。倒立型金属顕微鏡（PMG 3，オリンパス）から試料ステージをとりはずし，顕微鏡本体を改造してパルスモーター制御のXY電動ステージ（BIOS-101T，シグマ光機）を取り付けた。これにより，100nm精度で試料位置の制御が可能となった。このステージは通常観察にも使える構造である。すなわち，ひとつの対物レンズで焦点合わせをした後は，5倍から80倍までの対物レンズをレボルバーの回転のみで自由に切り替え可能である。倍率切換えの度に粗動によるレンズの上げ下げをする必要がないのは使い勝手の上で優れているが，このためにはAFMヘッドの重量がかかるステージ中央の穴周辺の肉厚をかなり落とす必要があり，強度や振動に関しては不安であった。

いっぽう，AFMヘッドを搭載するためのステージは，マイクロメータによる手動XYステージにステンレス平板を連結し，試料ステージに平行に接触させる単純な構造のものとした。この平板（厚み2～3 mm）と試料ステージの間隙にはテフロンテープを挟み，両者の干渉を低減した。これらのステージによるティップの位置制御，および試料の位置制御は所期の性能を満足するものであった。全体写真を図2，水中のカンチレバーをスライドガラスの下方から見た写真を図3に示す。

AFMの空間分解能は高く，ナノメータを超える。その性能を発揮するには，装置の振動によるノイズを極力排除する必要がある。ここで製作したステージの厚みは，対物レンズ近傍において3～4 mm（試料ステージとAFMステージの合算）と薄く，倒立顕微鏡を含め装置全体は除振台に載せてあるが，AFMイメージング中の振動の影響について確認する必要がある。直接的な振動解析はおこなえないので，実際のイメージング結果から評価した。また，AFMイメージング開始の度にパルスモーターの励磁を切る必要があった。

AFMイメージング

日吉紀要第35号で報告したように，これまでは，気液界面を利用して作成したタンパク質２次元結晶を疎水シリコンウエハ表面に移し取り（転写し），水中でAFMイメージングを行ってきた。膜は，転写後も２次元の結晶構造を維持することから，厚み方向に関しても分子間の相対配置が壊れないような力学的構造を有している筈である。これをウエハに移し取った場合には，ウエハ表面の粗さはAFM像にはそのまま反映されず，緩和されたものになると考えてよいであろう。したがって，基板に直接吸着して稠密パッキングしたものよりも表面粗さは小さく，それだけイメージングは容易になると考えられる。実際，ストレプトアビジン２次元結晶膜（日吉紀要第35号）の構造は結晶構造の表面イメージであり，ウエハ表面の粗さ（１～２nm）はこのイメージに大きな影響を与えていないように思われる（データは示していない）。

ステージの性能を検証するために，カバーガラスへの直接吸着法でフェリチンの稠密パッキングを作成し，水中でAFMイメージングをおこなった（図４）。フェリチン分子がガラス基板に不規則に密に吸着していることが明瞭に分かる。フェリチンは基板に直接吸着しているため，基板の凸凹の影響を直接受けている筈であり，２次元結晶を基板に転写した場合のAFM像と比較すると明らかに表面粗さが大きい。この点を考慮するなら満足できる像質と言える。ただし，もう少し積極的にステージの熱ドリフトや振動の影響を評価するには，これまでと同じ試料，同じシリコン基板を使ってイメージングをおこない，像質（２次元結晶に関してはフーリエ解析）の比較をする必要があろう。

考察

ガラス基板表面に作成したタンパク質２次元配列を市販の倒立型微分干渉顕微鏡ステージの上で水中AFMイメージング可能であることを実証した。このステージを使い，ガラス板上のタンパク質マイクロアレイ，細胞，繊維構造体等，ミクロサイズの透明体試料に対して光学顕微鏡観察と同時に分子分解能の構造研究が可能になると考えられる。また，同ステージはそのまま既有の蛍光顕微鏡（TE300, Nikon）にも移し替えが可能であり，AFMとの組み合わせによる研究の範囲を広げるものと期待している。

謝辞

本研究を遂行するに当たり，文部科学省科学研究費補助金（平成14～16年度，基盤研究(c)(2)）および慶應義塾福沢諭吉研究補助基金（平成14，15年度）による支援を受けた。

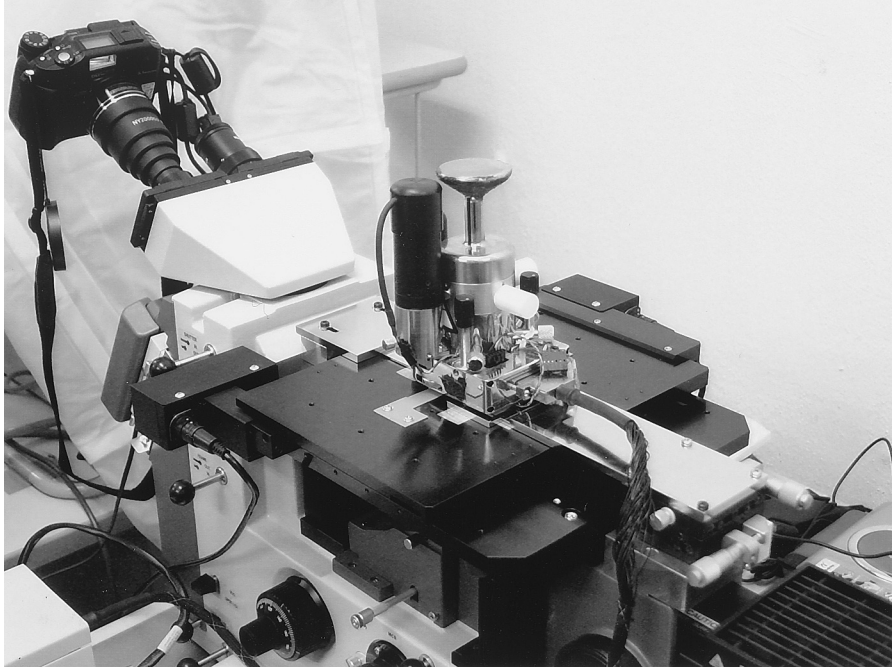

Fig.2
Photograph of the AFM head mounted on the inverted Nomarski microscope.
A digital camera (C5060, Olympus) is connected to the eyepiece tube of the Nomarski microscope to monitor both the tip and sample. In a strict sense, our AFM/Nomarski does not allow simultaneous optical and AFM image acquisition, because the laser light used to detect vertical tip-displacement interferes with capturing images with the optical system. However, we usually do not require simultaneous imaging by both AFM and optical microscope. When monitoring the tip and/or specimen, the laser light is turned off, and for approaching a sample adhered to the coverslip, the tip end is brought about 15μm above the surface of the coverslip before entering the feedback loop for tapping mode AFM imaging.

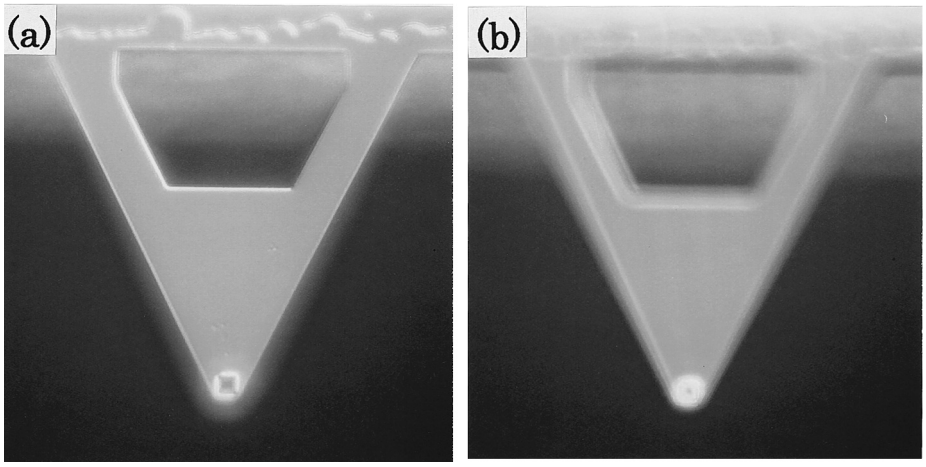

Fig.3
A triangular cantilever with pyramidal tip (TR-800, 100μm-length, Olympus) viewed with the Nomarski/DIC microscope in water from beneath a glass slide with thickness of 0.9 mm.
(a) The cantilever plane is focused and the base of the inverted pyramid of the tip is seen as a dark square, and in (b) the focus plane was lowered by 3μm and the tip apex showed up as a dark minute point at the center of the square of the pyramidal base.

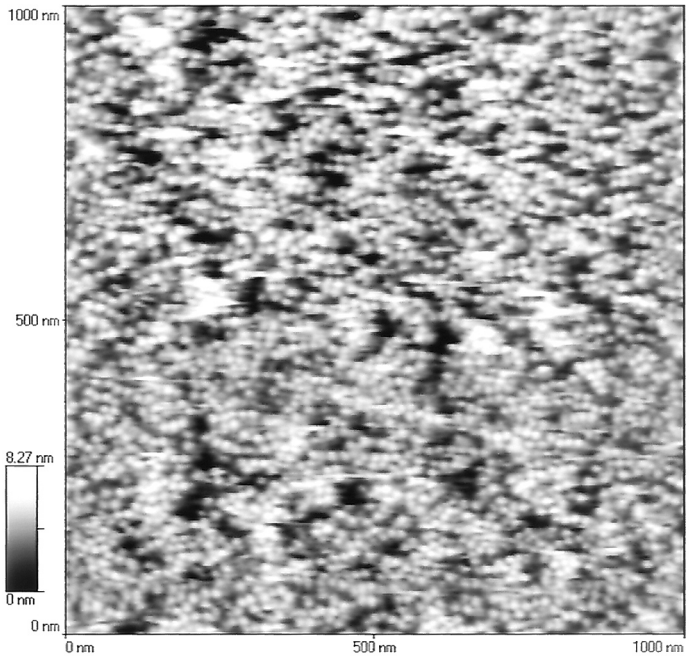

Fig.4
Ferritin molecules imaged in water by AFM on Nomarski microscope. The sample was prepared by adsorption to a hydrophobic surface of glass just by placing a drop of ferritin solution (1mg/ml) on a coverslip and rinsing with pure water after 30min of incubation.