

# 當奈米探針工程師遇到新型原子力顯微鏡—新表面特性辨識技術

## When a Nano-Probe Engineer Meet a New Type of AFM—a Novel Analysis Technology for Surface Property

高豐生、朱仁佑

Feng-Sheng Kao, Jen-You Chu

近年來新型原子力顯微鏡的普及，讓材料表面物理特性研究更加容易，可同時得到高解析的形貌、變形量、軟硬度、黏性等資訊。本團隊除了使用既有的 AFM 功能之外，利用修飾技術製作特殊 AFM 探針，除了可判斷表面微區的親疏水性、也可以鑑定生物分子間作用力，並以污染物探針鑑定抗汙效能。並量測不同超軟物質的楊氏模數，對於開發生醫材料領域有實質的幫助。本團隊也開發不沾黏的 AFM 探針，改善黏性高分子影像掃描的問題。所開發出的新技術期望在未來可以協助並縮短新材料開發時間，落實應用到先進的工業技術領域。

The new type of atomic force microscopy is becoming more prevalent. The powerful functions make it easier to study physical properties of surfaces. Some information such as elastic modulus, deformation, and adhesion can be obtained at the same time without compromising highest resolution. In this study, mechanic property measurement of soft matter is conducive to biomaterials development. By modifying AFM tips with functional groups, the recognition of specific surface properties is achieved, that is molecular recognition force microscopy. Our laboratory had developed several functional tips which can distinguish hydrophilic or hydrophobic surfaces, antifouling efficacy and so on. In this study we provide a method for determining the antifouling ability of a material surface, which is based on AFM with pollutant-coated AFM probes. We also improve the anti-stick property of AFM probe and extend probe's life time, which solves the stickiness problems when scanning polymer samples. We expect this technology can significantly shorten the time of developing new materials for the manufacture and speed the implementation of the novel technology in industry.

### 一、新型原子力顯微鏡

AFM 是利用針尖原子與樣品表面原子間微弱的作用力，使懸臂樑產生微小位移來作為回饋，以維持針尖能以固定微小力道在樣品上方掃描，從而

得知樣品表面的高低起伏。以往 AFM 掃描模式如接觸式及輕敲式，只能區分材料的少部分特性，例如摩擦力顯微鏡 (lateral force microscopy, LFM) 與輕敲式的相位訊號 (phase signal)。若想細分到底是吸引力或是排斥力、樣品的變形量、黏彈特性…

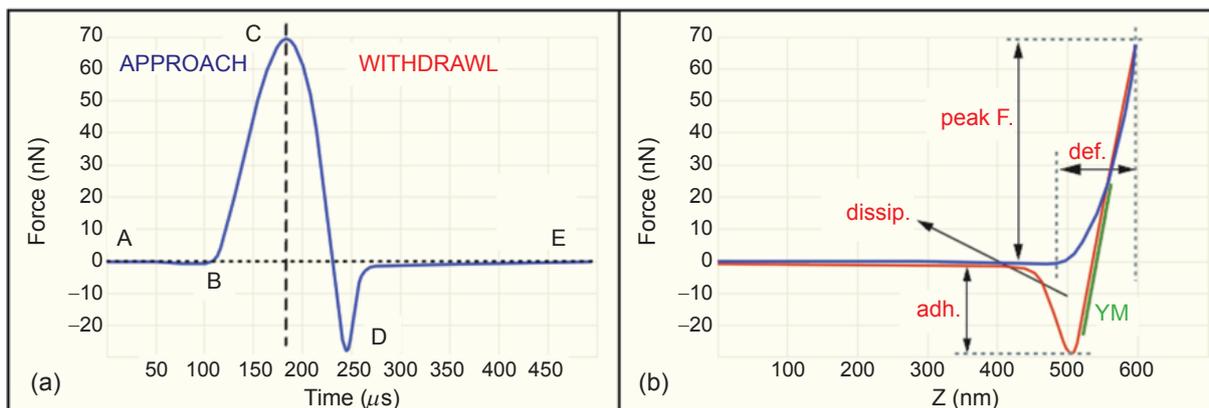


圖 1. 力曲線圖所表示的黏性、形變、模數等資訊

等，必須對特定區域取單點的力曲線 (force curve) 才可得知更詳細的資訊，如圖 1 所示 (圖片來源：Bruker AFM Handbook)。測力曲線的速度是很慢的，因此通常只對特定的區域進行量測。但若想知道整個面積的資訊，就必須犧牲解析度或是長時間量測。新一代的 AFM 是採用高速力曲線掃描方式，不再是用探針的共振頻去驅動探針，而是利用壓電材料 (piezo) 給予整個探針直上直下的運動去敲擊樣品，搭配強大的訊號處理與演算方法，在掃描的同時，得到所有力曲線應有的資訊，例如黏性、樣品變形量、DMT 模數、能量耗散…等，且各種資訊都與形貌有相同的解析度，分析表面力學特性更加方便。若在探針表面上修飾特定分子，藉由 AFM 來感測樣品表面分子，可提升樣品表面分子的辨識度，並藉此了解相互間的力學行為，分析鑑定樣品表面的多樣特性。因為力的來源是由於探針上的功能化分子與樣品表面特徵分子間的各種不同物、化性鍵結力，所以這樣的掃描探針技術稱為分子辨識力譜顯微鏡 (MRFM)<sup>(1)</sup>。MRFM 技術。這方法是利用已知探針上所修飾的材料，經由力譜呈現觀測未知的表面的材料分佈，可以增加材料分辨力，加上新型態定量力學 AFM 掃描技術，大幅提昇其可用度。本研究是以新型的 AFM，針對超軟物質測量其機械特性。另外也利用探針修飾，開發出多種新的表面特性鑑定方法，例如親疏水性、抗汙效能鑑定、生物分子間作用力等。另外也針對容易沾黏的樣品，開發出不沾黏的探針，提高影像清晰度。

## 二、微區軟硬度辨識技術

材料的軟硬度，最具代表性的數值為楊氏模數 (Young's modulus)。楊氏模數原本的定義為：當一材料受到一正向應力  $\sigma$  (單位面積受力) 時，會產生一正向應變 (單位長度的變化量)，而其比值  $E$  即為楊氏模數，可表示成  $E = \sigma/\epsilon$ 。若較硬的材料受到一應力時，其應變量較小，楊氏模數較大，同理，越軟的材質楊氏模數越小。藉由接觸應力分析，Hertz model 理論提供了下壓力量與楊氏模數的關係。以球型探針為例，簡化關係式可表示為<sup>(2)</sup>：

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \delta^{\frac{3}{2}}$$

$F$  代表下壓力量， $R$  代表下壓探針尖端的曲率半徑， $\nu$  代表材料的蒲松比 (不可壓縮材料的  $\nu$  為 0.5)，而  $\delta$  代表壓入樣品的深度。

AFM 本身就是一台精細的硬度量測裝置，施力範圍約為 pN- $\mu$ N，且其功能早被廣泛應用在細胞生物學。除了掃描細胞表面的形貌之外，也可以將探針「壓入」細胞，量測其機械性質，此方式已經廣被應用在量測生物細胞的彈性<sup>(3)</sup>。細胞的生長與基材的軟硬度有關聯，在材料開發方面必須調控細胞喜歡的環境，才會讓細胞有較佳的生長狀態<sup>(4)</sup>。另外，細胞各部位與基材的軟硬度分布也是研究者們相當感興趣的資訊，AFM 就曾經被利用在量測細胞與基材各部位的黏性與楊氏模數，如圖 2 所示<sup>(5)</sup>。過去的 AFM 是以設定掃描區域分割成矩

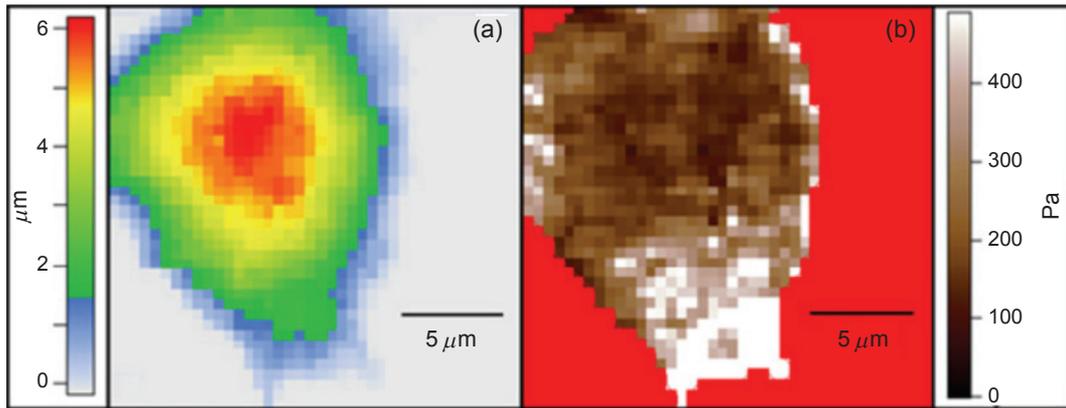


圖 2. 細胞形貌與各部位的楊氏模數分布<sup>(5)</sup>。

陣，在各個位置量測單條力曲線，最後計算出黏性與模數，但此量測速度相當緩慢，可能一張  $256 \times 256$  pixels 的硬度圖要十幾個小時才會完成。然而新型的 AFM 掃描模式是以快速直上直下的敲擊，並且即時分析力曲線，將計算出的數值與高度影像一同呈現，一張  $512 \times 512$  pixels 的高解析影像在 1 小時內即可完成。圖 3 即為筆者以高解析並超大面積掃描幹細胞生長在細胞之架的 AFM 影像。左圖為細胞形貌，右圖為對應之硬度，以高解析的方式呈現細胞與下方支架的硬度分布。從形貌上來看，不易看出細胞與細胞支架間的相對位置，然而從軟硬度訊號可以明顯區分出細胞位置，且細胞硬度約為 150 kPa，細胞支架約為 500 kPa。

AFM可量測的硬度的範圍大約是多少？本研究團隊量測數種不同的材料，並參考文獻各種材料的楊氏模數，如圖 4 所示。一般來說，市售 AFM 懸臂最大可施加力道大約是數百  $\mu\text{N}$ ，以筆者的經驗，以此力道大約可以量測較硬的高分子材料或是較軟的金屬，大約在 100 GPa 以內都還算精確，若是更硬的材料就稍嫌吃力，通常  $E$  值到達百 GPa 就需要使用專用的奈米壓痕機了。然而 AFM 對於軟材料的表現就相當優異，筆者量測許多不同硬度尺度的樣品，從數十 MPa 的橡膠，到較軟的生醫材料，例如數 kPa 左右的玻尿酸 (交聯後)，以及商用的細胞支架，甚至更軟的低濃度 gelatin，僅僅只有數十 Pa 都可以量測出來。當然，對於我們常吃

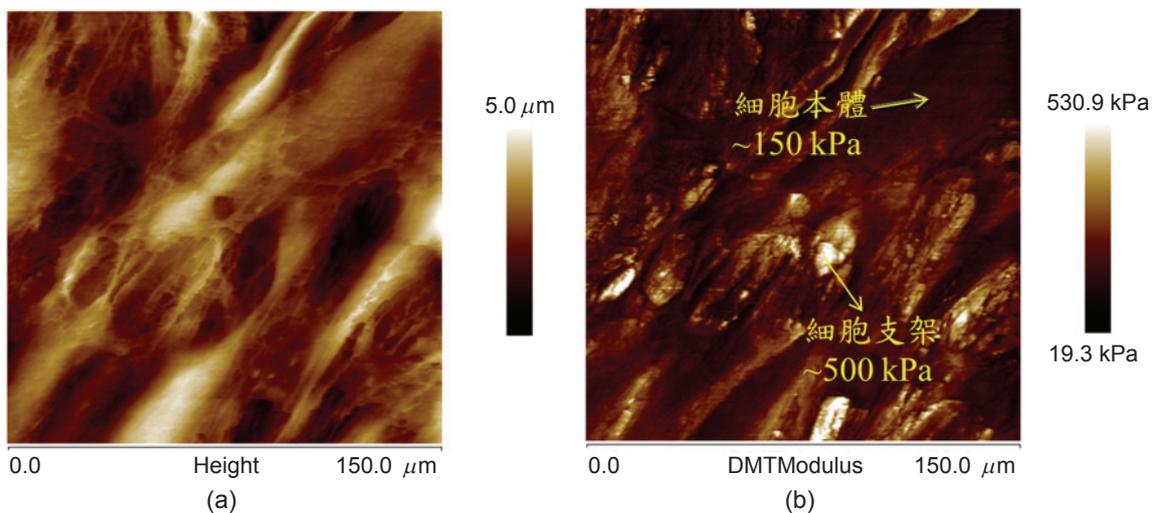


圖3. 細胞生長在細胞支架的 (a) 形貌與 (b) 模數分布。

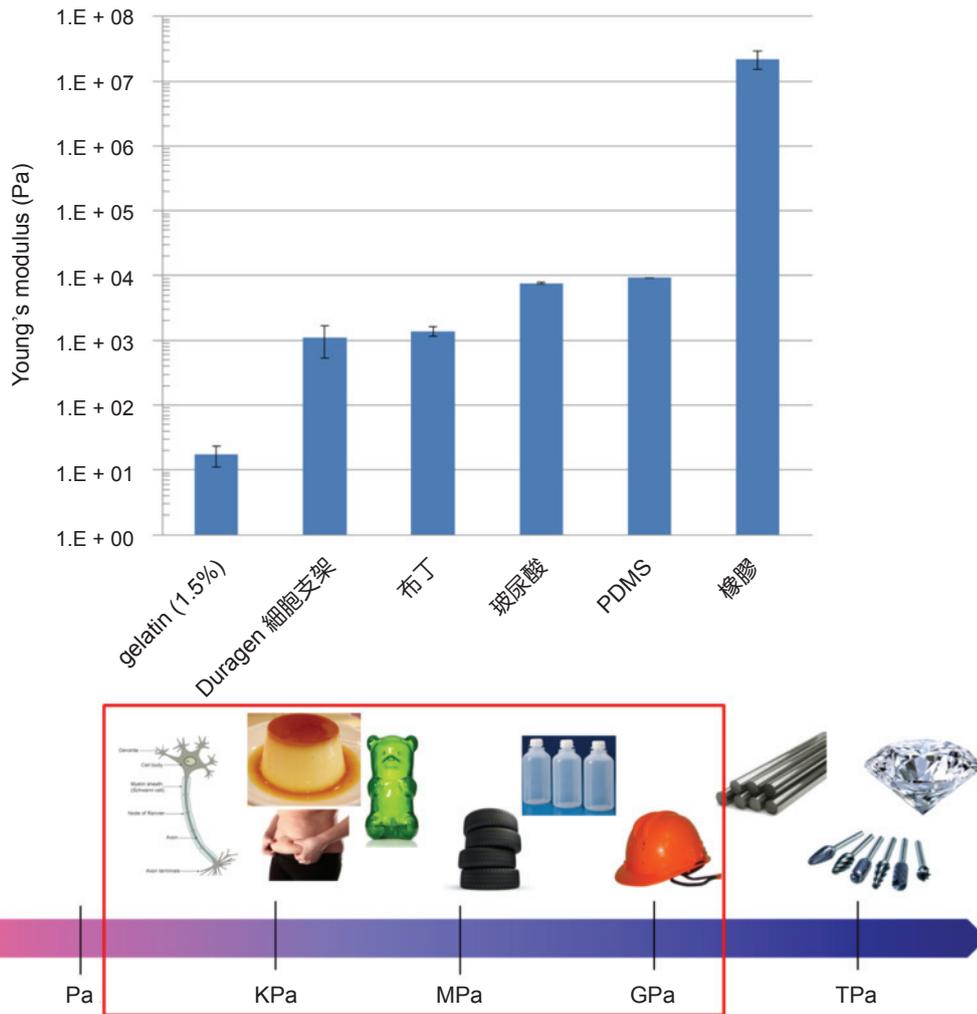


圖 4. 以 AFM 量測各材料的  $E$  值以及紅框內表示可量測的硬度範圍。

的布丁也可以量測， $E$  值大約為 1 kPa 左右。AFM 量測硬度範圍到底如何？簡單來說，只要是凍膠型態 (gel) 到一般常見的塑膠都行。

### 三、微區親疏水性鑑定技術

一般量測親疏水性，是將水滴滴在材料表面量測其接觸角。水滴約毫米大小，因此所量測到的親疏水性是水滴覆蓋面積的整體表現。若材料本身是混成材料，具有微米級的區域性分布，就需要用其他的方式鑑定微小區域的親疏水性分布。筆者所使用的微區親疏水檢測技術，是將疏水性官能基修飾在探針針尖，製作成特殊的疏水探針，在水中掃

描樣品。原因是在水中疏水的  $\text{CH}_3$  與  $\text{CH}_3$  官能基間有很強的分子間作用力<sup>(6)</sup>，若針尖的  $\text{CH}_3$  與表面的  $\text{CH}_3$  接觸，就會偵測到較大的黏性訊號。讀取黏性訊號圖，就可以辨識出微觀區域的親疏水性分布。圖 5 為筆者在奈米結構 nanodot 上修飾  $\text{CH}_3$  官能基。當疏水探針掃描至 nanodot 時，探針與樣品間會產生極強的黏性，由結果可看出奈米顆粒上的黏性較高，可達 6 nN，周圍無  $\text{CH}_3$  官能基的黏性約為 2 nN。若黏性訊號對應接觸角的關係，筆者做了簡易的測試，利用三種不同的基材：玻璃、親水性處理後的玻璃、疏水處理後的玻璃，三者的接觸角分別為 71 度、接近 0 度、103 度。以三支不同的疏水探針量測樣品表面黏性，並且量測數值對

CH<sub>3</sub> 樣品黏性值歸一化處理，得到的結果如圖 6。由結果可看出黏性數值與接觸角有固定的趨勢，一方面可看出本研究團隊修飾探針的穩定性，另外也可以得到微觀量測的黏性值與接觸角的對應關係。當然本測試是以實驗法做出結論，若要有理論支持，就要回歸到表面能的理論推導<sup>(7)</sup>，這邊就不再做更細的探討。

#### 四、生物分子間作用力量測

此外，AFM 也可以在液相中操作，正好符合生物體在自然中的狀態，此功能大大增加 AFM 在生命科學領域的應用。許多研究在將探針上面修飾生物分子，可以與基材表面的生物分子反應，此方法以被應用在研究蛋白質間作用力 (protein-protein

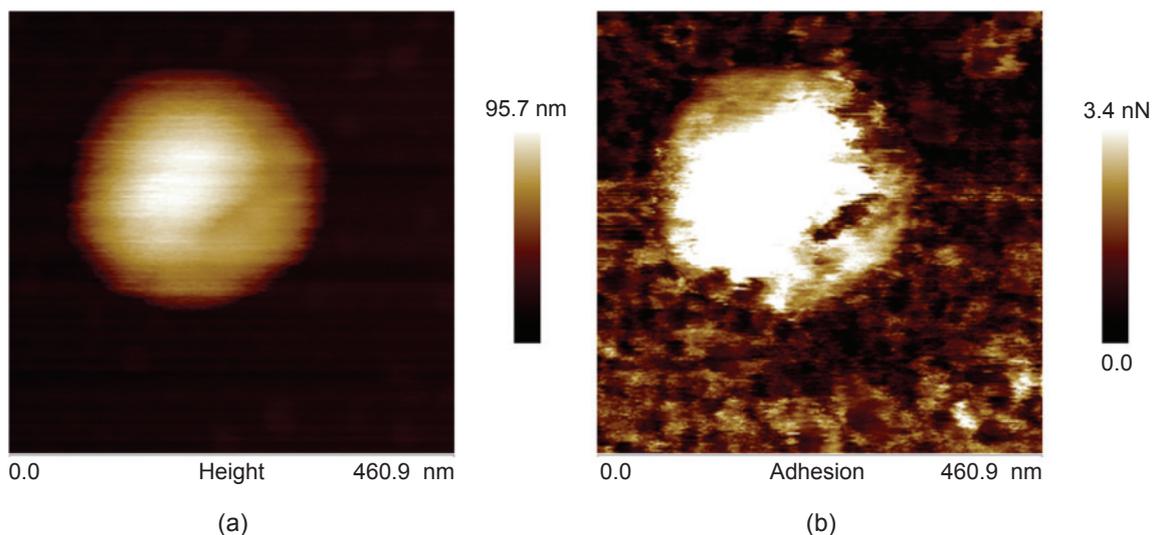


圖 5. AFM 疏水探針量測表面改質後 nanodot 的 (a) 形貌與 (b) 黏性訊號。

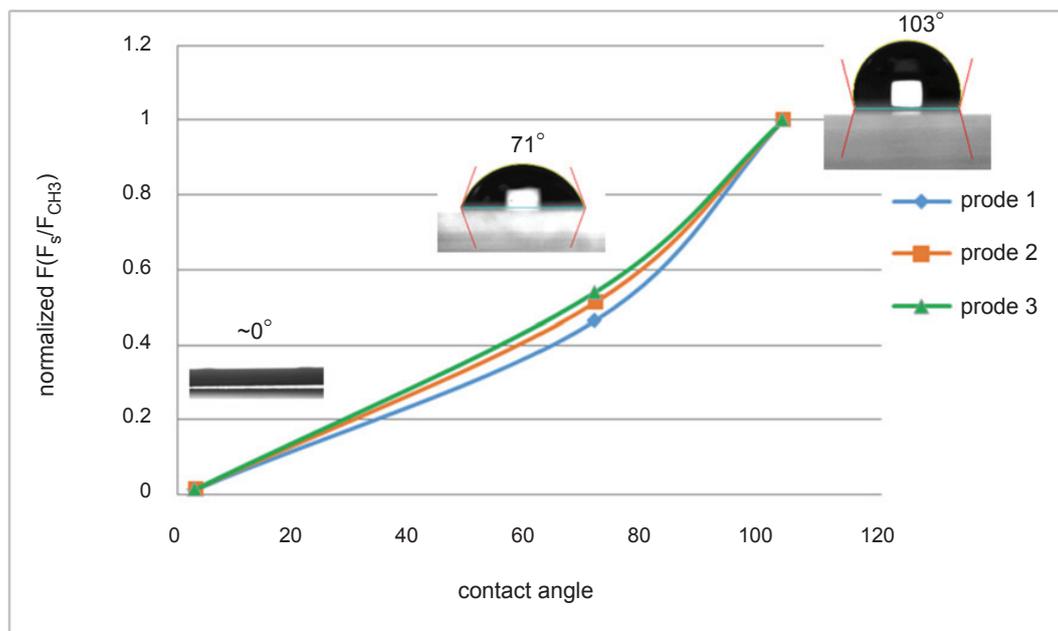


圖 6. 疏水探針黏性值與接觸角的固定趨勢。

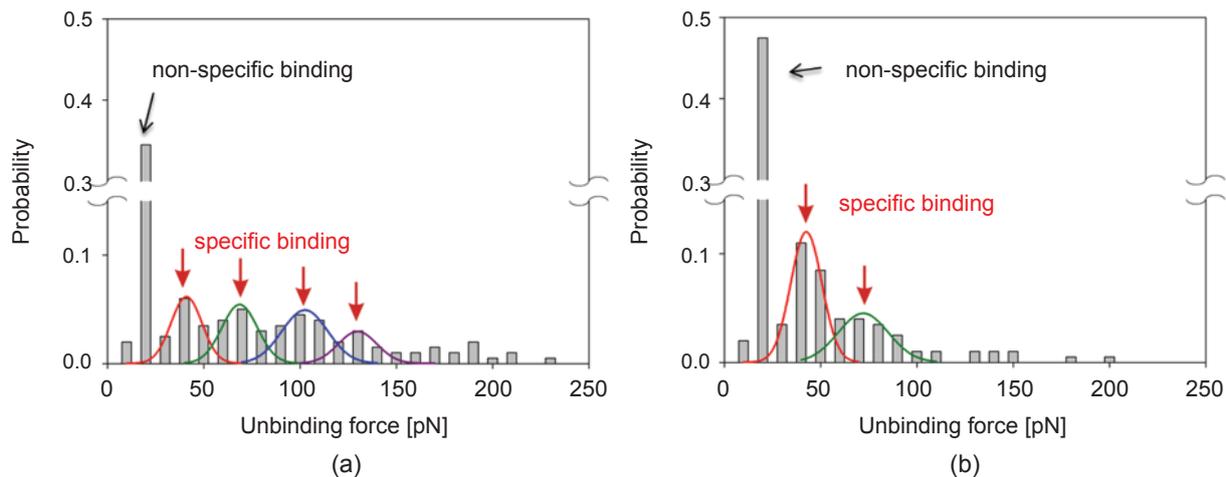


圖 7. 細胞上受器蛋白間的黏性數值分布 (a) 與加入抗過敏藥物 (b) 黏性降低。

interaction)，例如抗體與抗原間的分離力<sup>(8)</sup>。也有一些研究顯示，修飾生物分子的探針，也可以和細胞表面特定區域的受器蛋白結合<sup>(9)</sup>。筆者曾以抗過敏藥物為研究目標，探討藥物對細胞上受器蛋白的影響。過敏反應發生的原因，是因為抗原提呈細胞 (antigen-presenting cell, APC) 接觸到過敏原之後，會在表面產生許多的接受器，這些接受器會和 T 細胞表面的接受器結合<sup>(10)</sup>。目前發現免疫細胞 T 細胞上的 CD28 與 B 細胞上的 CD80 的結合，與過敏反應有很大的關係<sup>(11)</sup>。兩者結合後會大量釋放 IL2，造成過大的免疫反應，也就是過敏反應。因此，若是有種分子能夠阻斷兩者間的結合，將可以阻斷細胞內部訊號傳遞及接下來的生化反應，降低過敏反應，就成為抗過敏的候選藥物。本研究認為有阻斷效果的藥物，必定影響 CD28/CD80 的結合力，以原子力顯微鏡做為量測結合力的工具是再適合不過了。將 CD28 與 CD80 分別修飾在晶片與探針上，量測加入藥物前後的黏性數值，確實發現抗過敏藥物讓結合分子對的數目變少 (如圖 7 所示)，平均黏性降低，證實藥物的有效性<sup>(12)</sup>。

## 五、快速抗汙鑑定技術

與水有關的產品，都面臨生物汙垢生成的問題。其危害雖然不是立即性的危險，但經過長時間的累積，結垢物會漸漸腐蝕物品或是讓其功能漸漸消失。結垢的發生，往往與生物膜脫不了關係。生

物膜的生成步驟為：(1) 有機物／細菌吸附在基材表面，此時材料表面的特性已經改變。(2) 細菌繁殖，在表面產生生物膜。(3) 生物膜的厚度到達一定，藻類與貝類就可吸附上去，形成更厚的生物汙垢。市面上有許多號稱抗汙／抗垢／抗生物沾黏的產品，然而要如何定義其效能？目前仍然是以微生物培養、海洋實驗等讓汙染物到達肉眼可視的程度，再計算其數量，然而要進行這樣的試驗，往往要花上數天~數月的培養時間。以數量計算的盲點在於表面殘量均勻度會影響計算數值，誤判產品效能。若由汙垢最初生成原理來看，只要知道最初期原水中的有機物、細菌是否容易附著在表面，就可以推斷往後生物汙垢是否容易生成。因此本研究所提出的抗汙鑑定新方法，是將汙染物直接修飾在 AFM 探針上，形成汙染物探頭，針對材料表面量測黏性與凡得瓦力數值，就可鑑定出材料抗汙與否。本研究製作了三種不同的汙染物探頭，分別是植物腐化後的多醣類—腐植酸 (humic acid)，蛋白質類—牛血清白蛋白 (BSA)，以及無機物 SiO<sub>2</sub>。圖 8(a) 顯示探針修飾上汙染物後，可從 SEM 看出有明顯的有機物附著在上面。這三種汙染物探頭分別對於四種表面作黏性量測，由結果可看出目前文獻與市面上最廣被使用的抗沾黏材料 Polyethylene glycol (PEG)，對於汙染物探頭的黏性值最小，如圖 8(b) 所示。另外針對其他三種不同表面修飾的水處理濾膜，可明顯看出處理方式不同，對於汙染物的沾黏性也會不一樣。三種膜對於腐植酸的

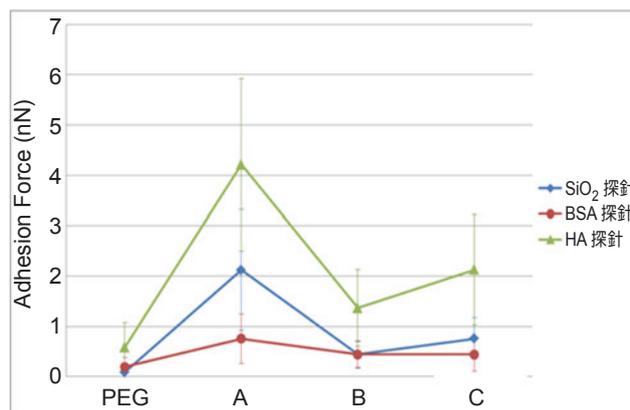
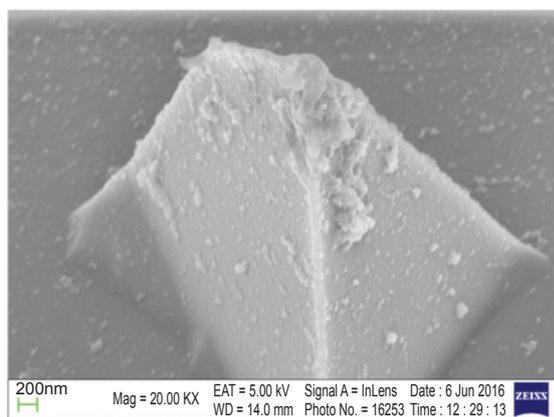


圖 8. 腐植酸污染物探頭的 (a) SEM 影像與 (b) 對於不同樣品的沾黏性測試。

黏性是最高的，可能是因為腐植酸是醣類分子且帶許多 COOH 官能基。膜對於 SiO<sub>2</sub> 探針的黏性僅次於腐植酸，可能與其帶負電特性有關，其等電點 (Isoelectric point = 1.7~3.5)。對於 BSA 的黏性最小，原因是因為 BSA 帶有最弱的電性 (IEP = 4.5)。有此方法可鑑定的污染物範圍如有機物，包含胺基酸、胜肽、蛋白質、多醣類、細胞、細菌、微生物，另外也可以包含無機物等奈米或微米顆粒。本技術將可因應未來的廣大市場需求如漁業、水處理業、海洋工業、衛浴用品、生醫材料、觸控面板等抗汙表面處理。

## 六、抗沾黏 AFM 探針

AFM 探針掃描最棘手的問題是碰到高沾黏性的樣品，例如高分子類，或是親水性的樣品，會有掃描影像不佳的問題。此樣品會造成探針接觸樣品後不易脫離，讓針尖與樣品有拖曳的現象。即使針尖脫離後，懸臂產生極大的震盪。探針震盪需要花時間回復到平衡位置，回復的過程越長，掃描影像越容易失真。這樣的擾動會影響探針穩定性，影像也就模糊了。當然，選擇懸臂較硬的探針或許可以解決此問題，但若樣品表面很軟，勢必又會被探針壓扁變形，仍然得不到真實影像。若樣品表面形貌粗糙，深寬比高，調控掃描參數就更加困難。唯一的解決方式，就是降低探針與樣品間不必要的黏性。本團隊的探針工程開發出具有抗沾黏性的探針，是將特殊的低表面能分子修飾在探針針尖，大幅降低黏性對探針的影響，因此也就提高影像解析

度了。圖 9 結果是一般探針與抗沾黏探針的比較。經過一般探針與抗沾黏探針的比較，使用抗沾黏探針的影像明顯銳利清晰，且黏性大幅降低。此探針可以解決過去黏性樣品影像品質不佳的問題，讓 AFM 掃描變得更輕鬆。

## 七、結論

筆者介紹本研究室所建立的多項高端檢測技術，主要是在微區親疏水性鑑定技術、超軟物質微結構力學觀測技術、分子生物力學檢測技術，及抗沾探針解決沾黏樣品的掃描問題，已經獲得許多突破性的初步成果，更能協助研發人員了解產品問題的學理機制，提供改善的證據。本研究所提出的污染物探頭，更是創新想法，直接量測汙染物單體對表面的黏性，在數分鐘內就能夠快速鑑定材料的抗垢特性，不用等到數周或數月才知道材料的效能，是全世界最直接快速的鑑定方式之一。未來本團隊會在各領域持續耕耘，建立相關的高端檢測分析技術，應用在水資源處理膜、儲能電池、環保材料、生醫材料及功能性纖維等能源、生醫、石化及民生等相關的產業上。

## 參考文獻

1. R. Barattin and N. Voyer, *Chemical communications*, **13**, 1513 (2008).
2. W. F. Heinz and J. H. Hoh, *Trends in biotechnology*, **17** (4), 143 (1999).
3. T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, S. A. Chizhik and R. I. Zhdanov, *Micron*, **38** (8), 824 (2007).

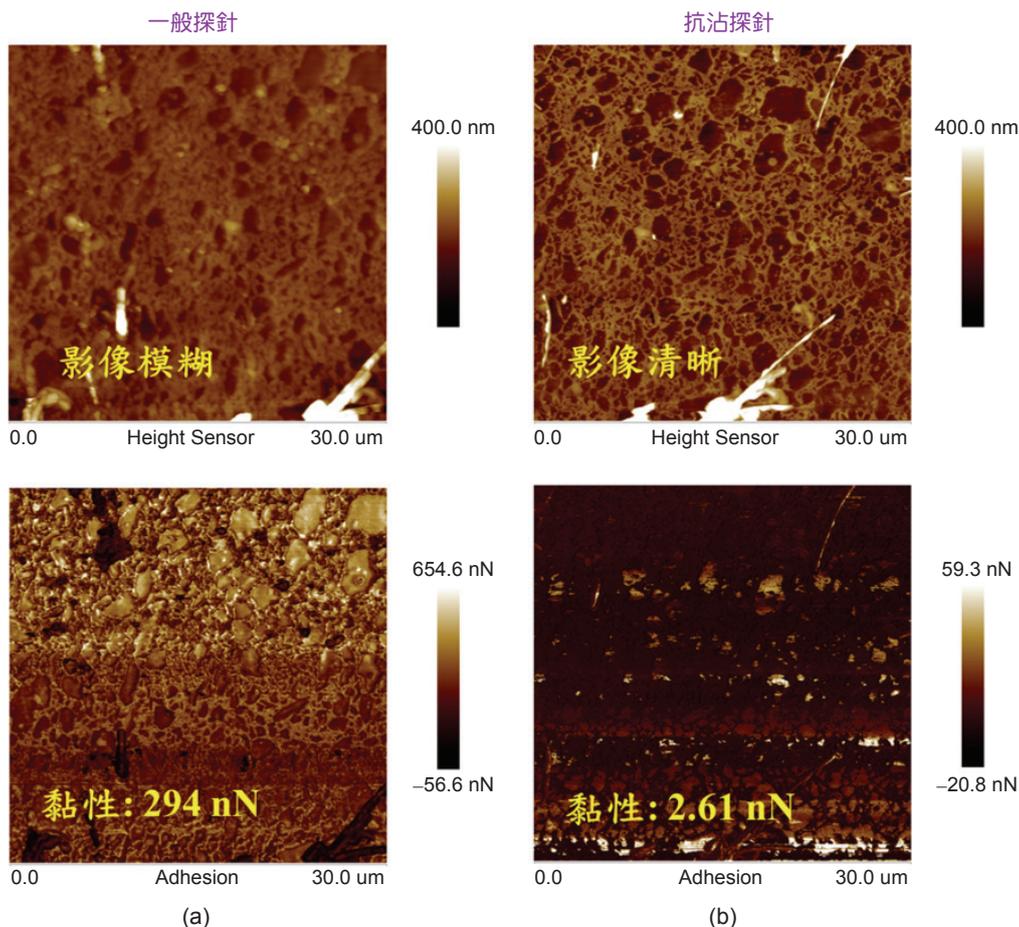


圖 9. 一般 AFM 探針 (a) 與抗沾黏探針 (b) 的影像與黏性比較。

4. K. Saha, A. J. Keung, E. F. Irwin, Y. Li, L. Little, D. V. Schaffer and K. E. Healy, *Biophysical Journal*, **95** (9), 4426 (2008).
5. E. Spedden and C. Staii, *International Journal of Molecular Sciences*, **14** (8), 16124 (2013).
6. A. Noy, D. V. Vezenov and C. M. Lieber, *Annual Review of Materials Science*, **27** (1), 381 (1997).
7. Y. Wu, T. Yu, T. A. Gilbertson, A. Zhou, H. Xu and K. T. Nguyen, *PloS one*, **7** (5), e36885 (2012).
8. P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher and H. Schindler, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93** (8), 3477 (1996).
9. M. Duman, M. Pflieger, R. Zhu, C. Rankl, L. Chtcheglova, I. Neundlinger, B. Bozna, B. Mayer, M. Salio and D. Shepherd, *Nanotechnology*, **21** (11), 115504 (2010).
10. G.-C. Dong, P.-H. Chuang, M. D. Forrest, Y.-C. Lin and H. M. Chen, *Journal of medicinal chemistry*, **49** (6), 1845 (2006).
11. A. H. Sharpe and G. J. Freeman, *Nature Reviews Immunology*, **2** (2), 116 (2002).
12. F. S. Kao, W. Ger, Y. R. Pan, H. C. Yu, R. Q. Hsu and H. M. Chen, *Biotechnology and bioengineering*, **109** (10), 2460 (2012).



高豐生先生為國立交通大學機械所博士，現任工業技術研究院材料與化工研究所研究員。

Feng-Sheng Kao received his Ph.D. in mechanical engineering from National Chiao Tung University. He is currently a researcher at Material and Chemical Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute.



朱仁佑先生為國立清華大學物理所博士，現任工業技術研究院材料與化工研究所正研究員。

Jen-You Chu received his Ph.D. in the Department of Physics from National Tsing Hua University. He is currently a principal researcher at Material and Chemical Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute.