

УДК 53.084.2 + 53.086 + 621.3.035.223.65

© М. В. Жуков, С. Ю. Лукашенко, И. Д. Сапожников, М. Л. Фельштын,
О. М. Горбенко, С. В. Пичахчи, А. О. Голубок, 2022

МНОГОМОДОВЫЙ СКАНИРУЮЩИЙ МИКРОСКОП ИОННОЙ ПРОВОДИМОСТИ С СИСТЕМОЙ ПЬЕЗОИНЕРЦИАЛЬНОГО ПЕРЕМЕЩЕНИЯ

Разработан сканирующий микроскоп ионной проводимости (СМИП) с системой пьезоинерциального перемещения, работающий в нескольких модах: режиме постоянного тока, режиме модуляции тока и прыжковом режиме (hopping). Созданы и протестированы нанозонды в виде стеклянных нанопипеток с внутренним радиусом $r \sim 50$ нм. Измерены вольт-амперные характеристики $I(V)$ и зависимости тока от расстояния между зондом и образцом $I(z)$ (кривые подвода/отвода). Получены изображения полимерного тестового объекта с периодической структурой и биологического объекта (СНО клетка), проведена оценка их качества, обсуждаются особенности работы СМИП в различных режимах. Многомодовый СМИП обеспечивает неразрушающую бесконтактную визуализацию мягких объектов в жидкой проводящей среде с нанометровым пространственным разрешением в различных измерительных режимах и может быть использован в биологии, цитологии, электрохимии и медицине при изучении неорганических мягких объектов, биологических объектов в буферных средах и т.п.

Кл. сл.: сканирующая зондовая микроскопия, сканирующий микроскоп ионной проводимости, нанопипетка, зонд, электролит, ионная проводимость

ВВЕДЕНИЕ

Сканирующая микроскопия ионной проводимости (СМИП) является одной из разновидностей сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), когда в качестве зонда используется стеклянная нанопипетка (НП) с радиусом внутренней апертуры ~ 50 – 100 нм. СМИП была предложена в 1989 г. Полом Хансма [1] и нашла широкое применение в цитологии [2], электрохимии [3], а также микро- и наноразмерной модификации поверхности [4]. Для более точного выбора места на образце СМИП обычно совмещают с оптической микроскопией. Интересно также сочетание СМИП с атомно-силовой микроскопией (АСМ) [5, 6]. В СМИП образец закрепляется на дне чашечки Петри, заполненной, как и пипетка, раствором NaCl. Внутри пипетки и чашки Петри размещены хлорсеребряные электроды, один из которых заземлен, а к другому приложено напряжение. В СМИП измеряется величина ионного тока, протекающего через пипетку между AgCl-электродами в процессе механического сканирования зондом относительно образца или образцом относительно зонда. В основе работы СМИП, как и в основе работы всех приборов СЗМ, лежит зависимость от расстояния между зондом и образцом с той разницей, что, в отличие от всех остальных типов СЗМ, в СМИП величина

сигнала уменьшается при уменьшении зазора между зондом и исследуемой поверхностью, а не увеличивается. Ионный ток трансформируется на поверхности AgCl-электродов в электронный ток, преобразуется с помощью преобразователя ток-напряжение (ПТН) в электрическое напряжение и подается на вход следящей системы (СС), которая с помощью петли обратной связи (ОС) регулирует положение зонда над поверхностью образца в процессе прецизионного механического сканирования.

При использовании СМИП различают три основных режима сканирования: режим постоянного тока (DC) [1], режим переменного тока (AC) [7] и режим последовательных циклов подвода-отвода, также известный в зарубежной литературе как "hopping" [8].

В режиме постоянного тока система слежения поддерживает постоянное значение ионного тока, протекающего через кончик нанопипетки, непрерывно корректируя координату сканера по оси Z. В режиме DC ионный ток увеличивается при удалении от поверхности и уменьшается при приближении к поверхности образца. На расстоянии до образца, превышающем радиус НП, система регистрирует ток насыщения I_{sat} , который ограничен только апертурой и сопротивлением самой НП. При выборе рабочего тока обычно устанавли-

вается значение, на $\sim(0.1-10)\%$ меньше, чем ток насыщения. Для режима постоянного тока характерна более низкая чувствительность по сравнению с другими методиками сканирования. Это связано с тем, что стабильная работа в режиме DC достигается только тогда, когда кончик НП удален достаточно далеко от исследуемой поверхности на расстояние, сравнимое с размером ее апертуры [8]. На таких расстояниях крутизна наклона рабочей области на кривой подвода невелика, что снижает чувствительность и пространственное разрешение метода.

Быстродействие системы слежения зависит от коэффициента передачи петли обратной связи, в которую входит передаточная функция СМПП-контакта. В случае DC-режима она определяется крутизной зависимости ионного тока от расстояния между НП и образцом. В DC-режиме рабочая точка на кривой подвода располагается в области $I \sim 0.1 \cdot I_{\text{sat}}$, где наблюдается изменение крутизны на зависимости $I(z)$, поэтому обратная связь работает в нелинейном режиме, что приводит к фазовым искажениям и разной скорости отработки впадин и выступов на поверхности. При этом может возникать потеря контакта, залипание НП в мягком образце либо поломка стеклянной НП на твердых участках. Это обычно происходит при сканировании в течение длительных периодов времени. Исходя из этих особенностей, в DC-режиме преимущественно измеряют мягкие образцы с достаточно гладким рельефом поверхности.

Кроме того, режим DC очень восприимчив к дрейфам электрохимического потенциала на хлорсеребряных электродах, это приводит к нестабильности ионного тока и электронному шуму, что ограничивает эффективность этого режима. Также этот метод оказывается очень нестабильным при температурных флуктуациях. На качество изображений в режиме постоянного тока могут влиять нелинейность проводимости и концентрирование ионов одного знака вблизи выходного отверстия пипетки [9]. Зарядка вершины пипетки в процессе сканирования [10] может стать причиной скачков ионного тока. Кроме того, отклик зонда при сканировании может зависеть как от изменения расстояния между торцом пипетки и исследуемой поверхностью, так и от локальной ионной активности, что усложняет задачу интерпретации результатов измерений.

В СМПП используются два способа работы в режиме переменного тока: за счет модуляции зазора в направлении оси Z или напряжения смещения, при этом выделяется переменный ток I_{ac} , возникающий на частоте модуляции. Амплитуда переменного тока используется в качестве входного сигнала СС и поддерживается постоянной

в процессе сканирования. При модуляции зазора амплитуда переменного тока пропорциональна производной $dI(z)/dz$, что делает этот режим более чувствительным к изменению рельефа поверхности. При модуляции напряжения смещения амплитуда переменной составляющей в токе пропорциональна производной $dI(V)/dV$, т.е. обратно пропорциональна сопротивлению СМПП-контакта, и уменьшается по мере сближения НП с поверхностью образца. При подключении СС следует учитывать, что в первом случае модуляции тока амплитуда переменной составляющей сигнала увеличивается при сближении НП с образцом, а во втором — уменьшается. Преимуществом режима переменного тока с модуляцией напряжения смещения является возможность работы с нулевым значением постоянного смещения, минимизируя электрическое воздействие на исследуемый объект, что особенно важно для нативных клеток.

Также AC-режим практически не зависит от дрейфов электрохимического потенциала на электродах, т.к. амплитуда модулированного сигнала не зависит от тока насыщения, и возникает только на расстояниях порядка радиуса нанопипетки.

Было установлено, что в режиме переменного тока сигнал намного более стабилен [7] и более чувствителен к положению нанопипетки вблизи поверхности по сравнению с откликом в режиме постоянного тока. В [11] представлен режим переменного тока с модуляцией напряжения, когда для устранения "емкостного эффекта" при зарядке пипетки осуществлялась компенсация емкости. В [12] рассмотрен режим, в котором с помощью синхродетектирования выделяется как резистивная, так и емкостная составляющие ионного тока и СС поддерживает постоянной амплитуду резистивной составляющей тока, осциллирующей в фазе с приложенным к AgCl-электродам переменным напряжением. Этот режим по сравнению с режимом постоянного тока менее чувствителен к электронному шуму и дрейфу, обусловленному электрохимическими реакциями, протекающими на электродах, поскольку направление химических реакций периодически меняется на противоположное, что увеличивает время сохранности AgCl-слоя на поверхности Ag. Однако режим модуляции ионного тока через модуляцию напряжения смещения все же дает низкое качество изображений при сканировании образцов с развитым рельефом поверхности.

Все рассмотренные выше режимы СМПП основаны на единообразном алгоритме измерений при непрерывной работе СС в процессе сканирования. Наибольшую стабильность демонстрирует режим последовательных циклов подвода-отвода [8] со следующим алгоритмом:

– НП, имеющая латеральные координаты $(X1, Y1)$, отводится вдоль координаты Z на исходное положение вдали от образца при $I = I_{\text{sat}}$;

– выставляется рабочее значение опорного тока, например $I = 0.1 \cdot I_{\text{sat}}$, включается сближение НП с образцом и с помощью СС захватывается ионный ток вблизи поверхности, равный опорному значению, запоминается координата $Z1$ положения сканера;

– НП отводится на исходное положение $I = I_{\text{sat}}$ и перемещается в следующую точку $(X1, Y1)$, цикл повторяется.

В режиме "hopping" обратная связь может работать как в режиме постоянного тока, так и в режиме переменного тока. Эта техника обходит недостатки, связанные с DC- и AC-режимами и позволяет визуализировать изображения образцов с развитым рельефом с высоким пространственным разрешением.

Тем не менее прыжковый режим также имеет недостатки, связанные с низкой скоростью визуализации из-за постоянного перемещения пипетки вверх-вниз [13, 14]. Увеличить скорости сканирования можно несколькими путями. Один из подходов предполагает уменьшение числа пикселей при сканировании за счет предварительного быстрого сканирования и дискретизации процесса сканирования на основе "сжатого" зондирования [15], что повышает скорость получения изображений, но негативно влияет на качество изображения. В частности, предварительное сканирование не подходит для сложных или шероховатых поверхностей. Второй подход укорачивает время визуализации уменьшением ненужного движения зонда за счет предсказания высоты в следующей точке изображения. Гибридное сканирование, сочетающее в себе режим постоянного тока и "hopping", может дать изображение с высоким разрешением за короткое время при использовании предсказания высоты в следующей точке изображения [16]. Однако в случае сильно шероховатых поверхностей эти методы все еще могут привести к столкновению пипетки с поверхностью образца. Третий подход основан на увеличении скорости работы пипетки в Z -направлении за счет уменьшения времени отклика пьезопривода на входной сигнал путем улучшения механических свойств пьезопривода [17], повышения его собственной резонансной частоты [18] или с помощью передовых алгоритмов управления [19]. Известны также решения, когда пипетка располагается под углом к исследуемой поверхности [20], что позволяет визуализировать микро- и наноструктуры с резкими боковыми стенками. Наконец отметим, что для адекватной интерпретации получаемых СМПП-

изображений необходимо правильно понимать физико-химические процессы, определяющие природу СМПП-изображений. Таким образом, важным разделом СМПП является компьютерное моделирование распределения плотности тока в отверстии пипетки и в области контакта с образцом [21].

В данной работе представлена многомодовая измерительная головка прибора СМПП. В предлагаемой конструкции, с целью улучшения ее компактности, увеличения частоты механического резонанса и повышения стабильности процесса подвода и сканирования, используется пьезодвигатель, в котором с помощью одного пьезоэлемента осуществляется как пошаговое "пьезоинерциальное" перемещение образца для захвата ионного тока перед началом сканирования, так и плавное перемещение для стабилизации СМПП-сигнала в процессе сканирования. В работе описана технология изготовления зондов в виде стеклянных нанокапилляров и представлены их микроскопические изображения, а также представлены и обсуждаются тестовые СМПП-изображения, полученные в различных режимах измерения.

ОПИСАНИЕ УСТАНОВКИ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве зондов использовались нанопипетки (НП) из боросиликатного стекла, формируемые на установке по вытягиванию пипеток РМР-107 (Micro Data Instrument Inc., США) с помощью теплового плавления и разрыва стеклянных капилляров с исходным внешним диаметром ~ 1.2 мм и внутренним диаметром ~ 0.6 мм. Использовались "hand-made" измерительная головка СМПП и блок управления/сбора данных. Измерительная головка располагалась на столе с активной виброзащитой Halcyonics Nano-20 (Accurion GmbH, Германия). Для контроля качества пипеток использовался сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) Inspect (FEI, США). После подбора оптимальных параметров тепловой вытяжки боросиликатных заготовок минимальный внутренний радиус вершины пипетки составил ~ 50 нм с углом заострения $\sim 3-5^\circ$ (рис. 1).

В качестве электродов использовались хлорированные нити серебра AgCl, а в качестве буфера водный физиологический раствор 0.9% масс. NaCl. Для снижения акустических шумов, тепловых дрейфов и электромагнитных наводок использовался защитный заземленный колпак. Измерения проводились при температуре около 21°C и влажности около 30–40%.

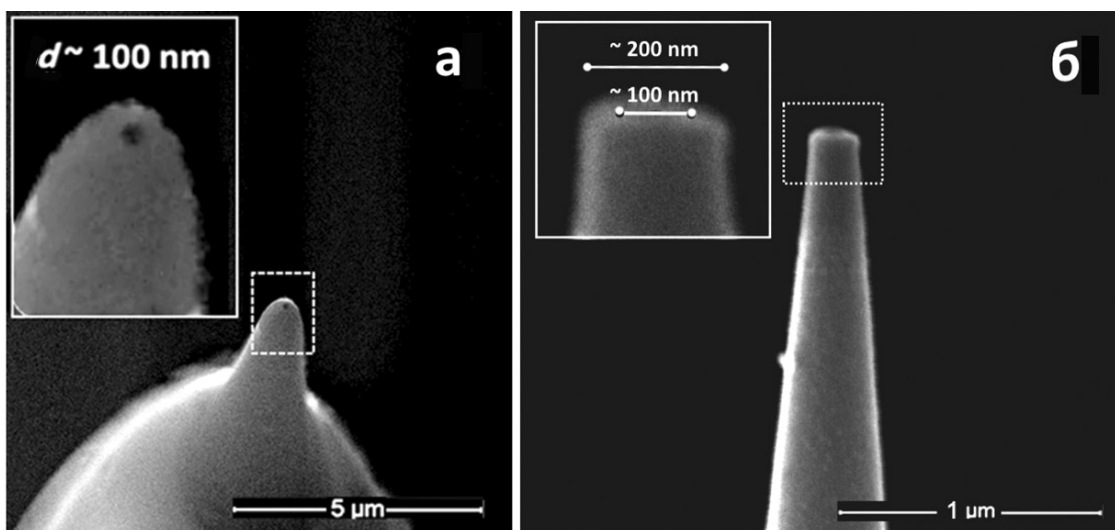


Рис. 1. Изображения НП в СЭМ.
а — вид в изометрии, б — вид сбоку

Следует отметить, что оценивать внутренний радиус пипетки можно не только прямым измерением в СЭМ, но также и косвенным измерением через проводимость пипетки в проводящем растворе по данным вольт-амперных характеристик (ВАХ) [22] (рис. 2, а). Так, зная сопротивление и угол заострения НП, можно оценить ее эффективный радиус по формуле (1):

$$R_p = \frac{1}{\pi \cdot \sigma \cdot r_i \cdot \tan \alpha}, \quad (1)$$

где σ — электропроводность, r_i — внутренний радиус пипетки, α — угол при вершине пипетки.

Расчетный и измеренный радиусы НП имеют хорошую корреляцию. Стоит отметить, что при малых размерах пипетки с течением времени на ее вершине может образоваться повышенная концентрация ионов одного знака, что приводит к эффекту "выпрямления" тока (рис. 2, б). В общем случае это можно считать паразитным эффектом при сканировании образцов, т.к. ток может изменяться при одном и том же напряжении с течением времени, однако в некоторых случаях этот эффект может быть полезен (например, в микрофлюидике и наноэлектронике для управления заряженными частицами в потоке или создания "жидких" диодов).

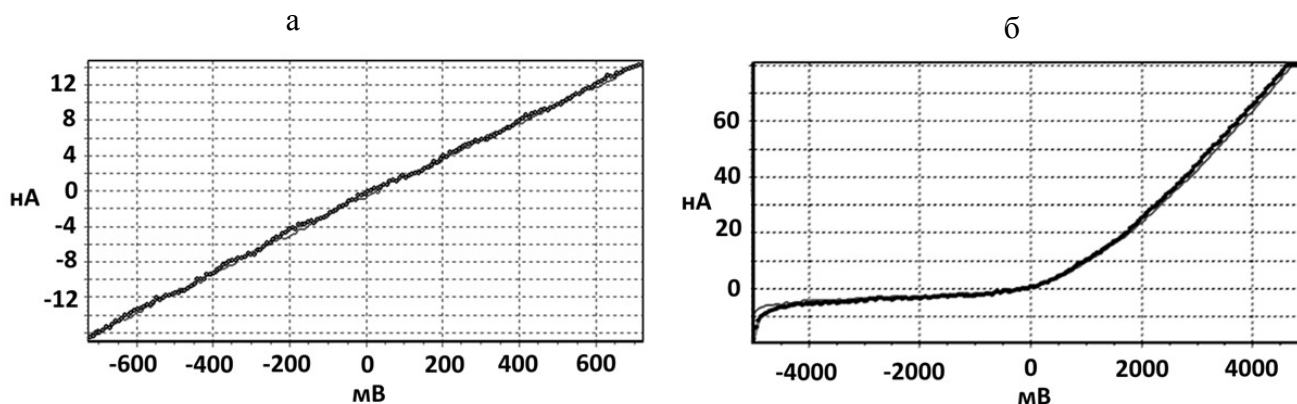


Рис. 2. Типичные значения ВАХ НП в растворе 0.9% масс. NaCl.
а — при первом погружении НП в раствор; б — эффект "выпрямления" тока [7], связанный с накоплением ионов одного знака вблизи пипетки (ионная блокада). ВАХ построены по многократно измеренным кривым

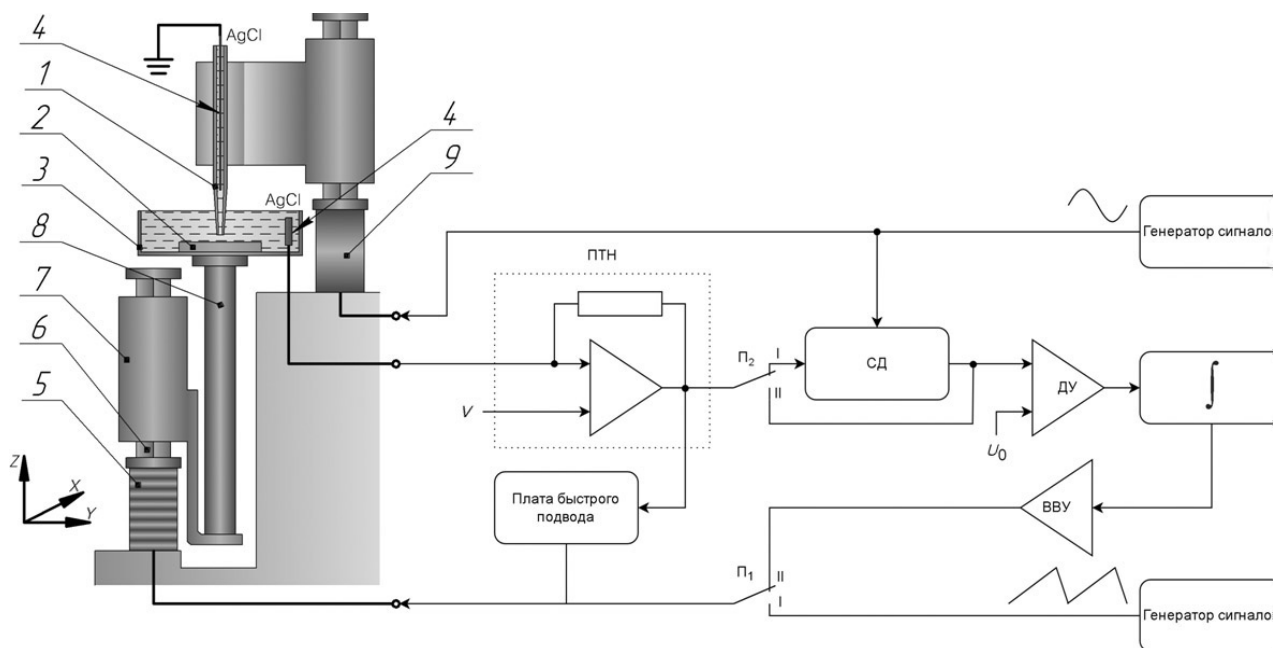


Рис. 3. Схема измерительной головки многомодового прибора СМВП с петлей обратной связи.

1 — НП с электролитом; 2 — образец; 3 — чашка Петри с электролитом; 4 — AgCl-электроды; 5 — пьезопакет; 6 — титановый стержень; 7 — каретка; 8 — пьезотрубка; 9 — пьезоэлемент; ПТН — преобразователь ток-напряжение; СД — синхродетектор; ДУ — дифференциальный усилитель; U_0 — опорное напряжение при сканировании; \int — интегратор; ВВУ — высоковольтный усилитель; П1, П2 — переключатели

На рис. 3 представлена схема измерительной головки с петлей обратной связи, обеспечивающая работу СМВП в режимах постоянного тока, переменного тока с модуляцией расстояния между зондом и образцом и в прыжковом режиме. В зазоре между зондом 1 в виде неподвижной стеклянной НП, заполненной электролитом, и образцом 2 на дне чашки Петри 3, также заполненной электролитом, протекает ионный ток под действием напряжения смещения V , приложенного между AgCl-электродами 4. Пошаговое сближение пипетки 1 и образца 2 осуществляется "пьезоинерциальным" способом с помощью пьезодвижителя на основе пьезопакета 5 (P885.1, Physical Instruments), управляемого асимметричными импульсами с резкими (~ 10 мкс) и плавными (~ 200 мс) фронтами. Асимметричные импульсы напряжения (рис. 4) подключаются к пьезопакету при замыкании контакта I переключателя П1. Один торец пьезопакета 5 приклеен к неподвижному основанию, а к противоположному торцу приклеен титановый стержень 6, к которому прижата каретка 7 с установленной на ней пьезотрубкой 8, обеспечивающей сканирование в плоскости (XY), на которой закреплена чашка Петри 3 с образцом 2.

Высоковольтные усилители, управляющие сканированием, на схеме не показаны. Диапазон сканирования в плоскости XY составляет 30×30 мкм.

Под действием резкого фронта пьезопакет 5 резко растягивается или сжимается в зависимости от знака электрического напряжения. В этом случае сила инерции, действующая на каретку 7, больше, чем сила трения. В результате каретка 7 скользит по поверхности направляющего стержня 6 вдоль оси Z. При действии плавного фронта управляющего импульса сила инерции меньше, чем сила трения, и проскальзывания не происходит. Направление движения каретки вверх или вниз можно изменить, сменив знак управляющего напряжения или поменяв местами передний и задний фронты управляющих импульсов. Как показано в [23, 24], используя СЗМ, можно точно измерить шаги пьезоинерциального движителя.

На рис. 4 представлены результаты пошагового измерения перемещения пьезоинерциального движителя 5, 6, 7 вверх/вниз вдоль координаты Z (рис. 4, а) и гистограмма (рис. 4, б) распределения величины шага при движении вверх соответственно. Видно, что средний шаг при движении образца вверх ~ 100 нм при максимальном значении шага 145 нм. Соответствующие значения при движении каретки 7 вниз примерно в два раза больше, что связано с действием силы тяжести. Диапазон перемещения образца вдоль координаты Z составляет ~ 5 мм. Такие параметры пьезоинерциального движителя обеспечивают надежное

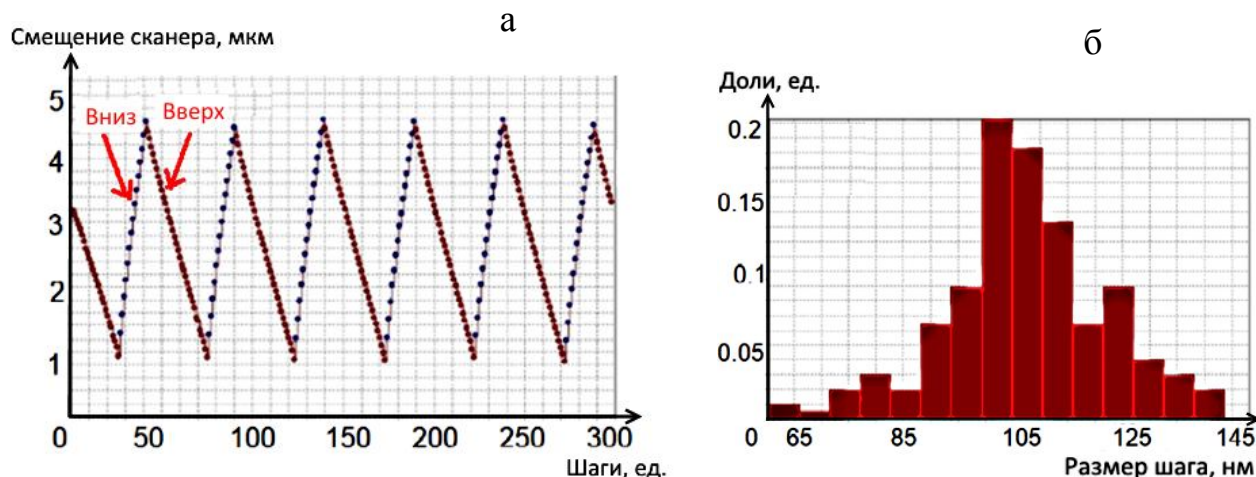


Рис. 4. Пошаговое измерение перемещения пьезоинерциального движителя вверх/вниз вдоль координаты Z (а) и гистограмма распределения величины шага при движении вверх (б)

"бескасательное" сближение зонда с образцом, что принципиально для СМИП, поскольку стеклянная нанопипетка, как правило, разрушается при малейшем столкновении с твердой подложкой.

Для перехода от режима подвода/отвода к режиму плавного сканирования пьезоупаков 5 включается в петлю ОС при замыкании контакта II и размыкании контакта I переключателя П₁. Теперь пьезоупаков 5 управляется плавно изменяющимся напряжением от ВВУ, каретка 7 удерживается силами трения и не проскальзывает по стержню 6, при этом пьезоупаков 5 обеспечивает плавное перемещение образца вдоль координаты Z , выполняя функцию исполнительного элемента СС. Диапазон плавного сканирования составляет ~ 7 мкм.

В нанометровом зазоре между торцом заостренного капилляра и образцом протекает ионный ток I_i , который на AgCl-электродах трансформируется в электронный ток и с помощью преобразователя ток-напряжение (ПТН), представляющего собой операционный усилитель с сопротивлением R в обратной связи, преобразуется в электрическое напряжение, пропорциональное ионному току $U = R \cdot I_i$. В нашем случае $R \sim 10\text{--}100$ МОм. В режиме постоянного тока контакты переключателя П₂ находятся в положении II. Напряжение U сравнивается на дифференциальном усилителе с опорным напряжением U_0 и подается на вход интегратора, а затем на вход высоковольтного усилителя, подключенного к пьезоупакову, перемещающему образец 2 вдоль оси Z таким образом, чтобы поддерживать в процессе сканирования постоянное значение ионного тока, протекающего через пи-

петку. В описываемом приборе режим переменного тока осуществляется за счет модуляции зазора между образцом и зондом с помощью пьезоэлемента 9, раскачивающего пипетку с заданной амплитудой и частотой ~ 1 кГц.

Для перехода в режим переменного тока переменное напряжение подключается к пьезоактюатору в виде биморфного пьезоэлемента, а также к одному из входов СД. Контакты переключателя П₂ переводятся в положение I, и возникающий в результате модуляции зазора переменный сигнал с выхода ПТН пропускается дополнительно через СД, опорным сигналом которого служит напряжение, раскачивающее пьезоэлемент 9. В результате в процессе сканирования СС поддерживает постоянную амплитуду переменного сигнала на частоте модуляции. Данная схема также может поддерживать и режим переменного тока с модуляцией напряжения. В этом случае переменное напряжение подключается не к пьезоактюатору 9, а через входное сопротивление операционного усилителя ПТН к AgCl-электроду, расположенному в чашке Петри.

В прыжковом режиме петля ОС коммутируется либо для работы в режиме постоянного либо переменного тока. Перед перемещением образца в новую координату образец сначала отводится от зонда вдоль координаты Z на определенное расстояние путем изменения опорного напряжения на инвертируемом входе дифференциального усилителя (ДУ) в петле ОС, затем с помощью сканера 8 образец переводится в новое положение, после чего в петле ОС восстанавливается прежнее

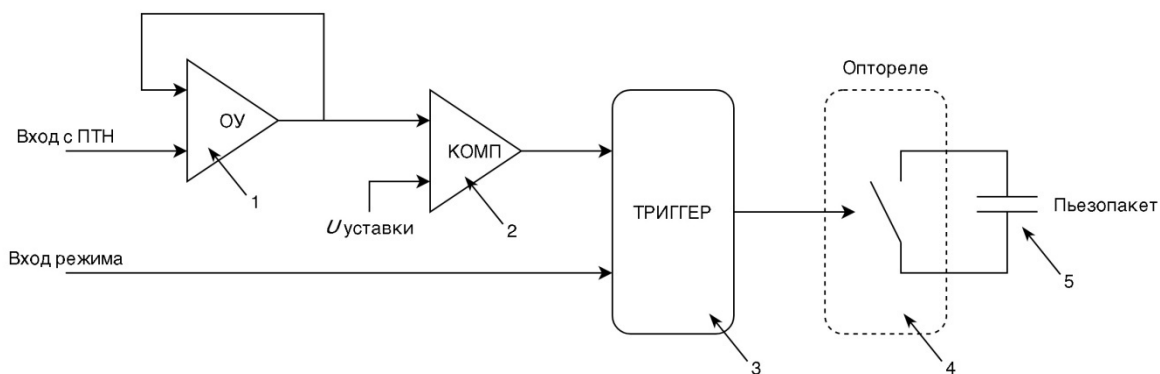


Рис. 5. Схема системы быстрого подвода.

1 — повторитель, 2 — компаратор, 3 — триггер, 4 — оптореле, 5 — пьезопакет

значение опорного напряжения U_0 . В результате СС захватывает сигнал, равный опорному значению U_0 в новой точке образца.

Для уменьшения времени подвода НП к образцу используется система быстрого подвода (рис. 5). Эта система подключается к выходу ПТН в режиме постоянного тока. Сигнал с ПТН поступает на повторитель 1 для увеличения входного сопротивления и далее сравнивается компаратором 2 с напряжением уставки. При приближении пипетки к образцу ток уменьшается, поэтому напряжение уставки устанавливается немного меньше напряжения, соответствующего току, протекающему через НП на отдалении от образца. Когда ток немного уменьшается при приближении к образцу, срабатывает компаратор и активирует триггер 3. Триггер включает оптореле 4, которое

шунтирует пьезопакет 5. При переключении режима работы с подвода на сканирование триггер сбрасывается, оптореле размыкается и не мешает проводить сканирование.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве тестового образца для тестирования различных режимов СМВП была выбрана полимерная реплика, снятая с тестовой калибровочной решетки TGZ02 (НТ-МДТ, Россия), представляющей собой набор периодически расположенных борозд высотой 110 ± 2 нм и периодом 3 ± 0.05 мкм (см. Приложение, рис. П1). На твердую поверхность калибровочной решетки TGZ02 наносился этиленвинилацетатный расплавленный ($78-80$ °С) полимер. Затем после остывания осуществлялось

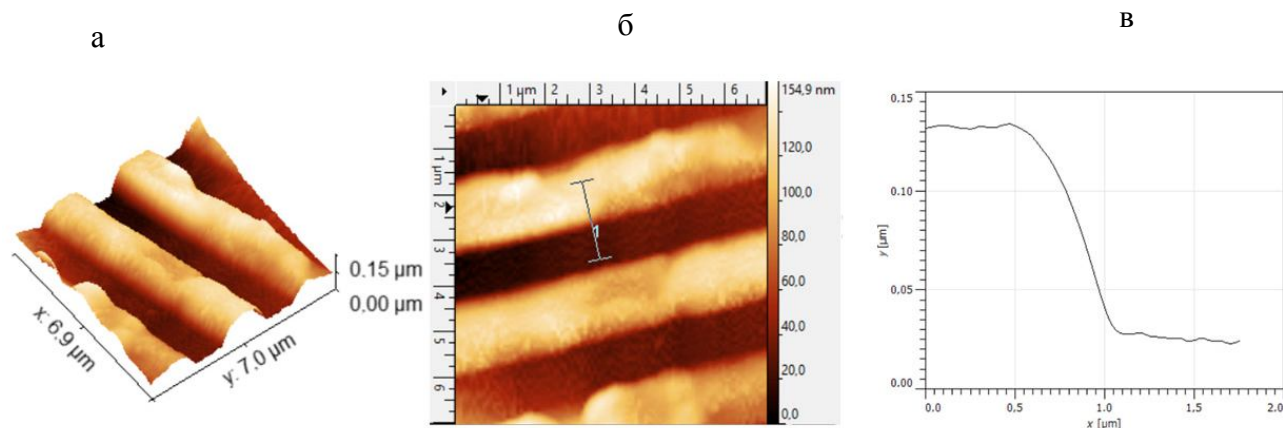


Рис. 6. АСМ-изображение реплики решетки TGZ02.

а — 3D-отображение, б — 2D-отображение, в — усредненное поперечное сечение ступеньки (выборка по 20 сечениям)

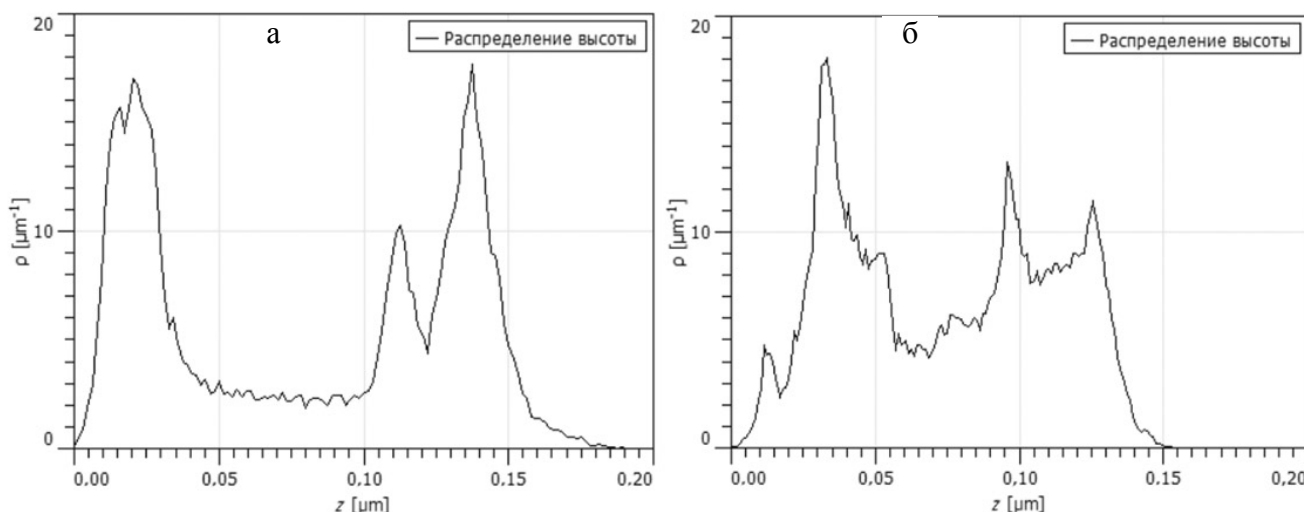


Рис. 7. Гистограммы распределения высот для АСМ-изображения решетки TGZ02 (а) и реплики решетки (б)

механическое надавливание (штамповка) и отслаивание полимера от поверхности исходной калибровочной решетки. АСМ изображение реплики решетки TGZ02 показано на рис. 6, гистограммы распределения высот на рис. 7.

Типичные значения зависимости тока от расстояния $I(z)$ приведены на рис. 8. Значения нормированы на ток насыщения в случае режима постоянного тока (СМИП DC) и на максимальное значение сигнала при заданном Z у поверхности в случае режима модуляции зазора (СМИП AC).

Видно, что кривая подвода, измеренная в режиме постоянного тока, демонстрирует уменьшение тока при уменьшении зазора между зондом и образцом, в то время как в режиме переменного тока с модуляцией зазора наблюдается обратная зависимость. Это связано с тем, что, модулируя Z и измеряя с помощью СД амплитуду переменной составляющей в ионном токе, мы фактически измеряем сигнал, пропорциональный dI/dZ , т.е. производную от кривой подвода, значения которой увеличиваются при уменьшении зазора.

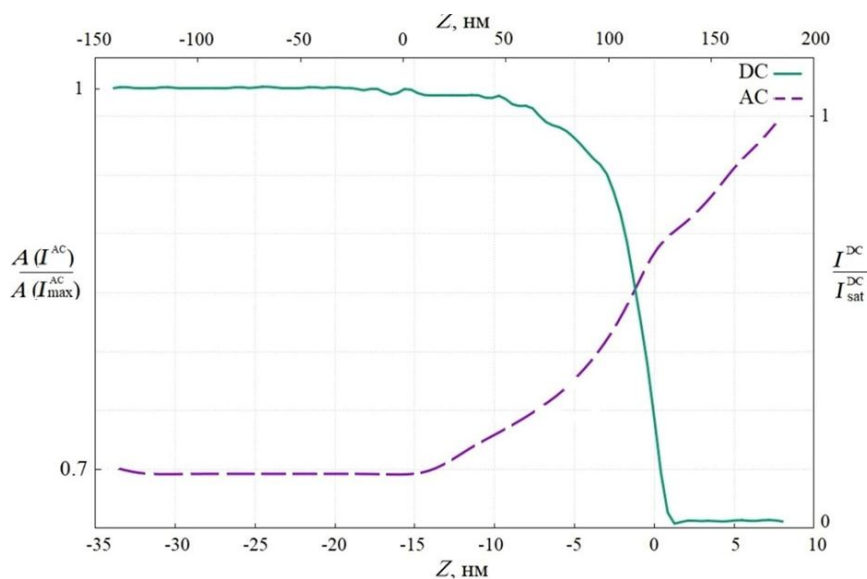


Рис. 8. Кривая подвода в режимах СМПП. Hopping в режиме постоянного тока DC и в режиме модуляции AC

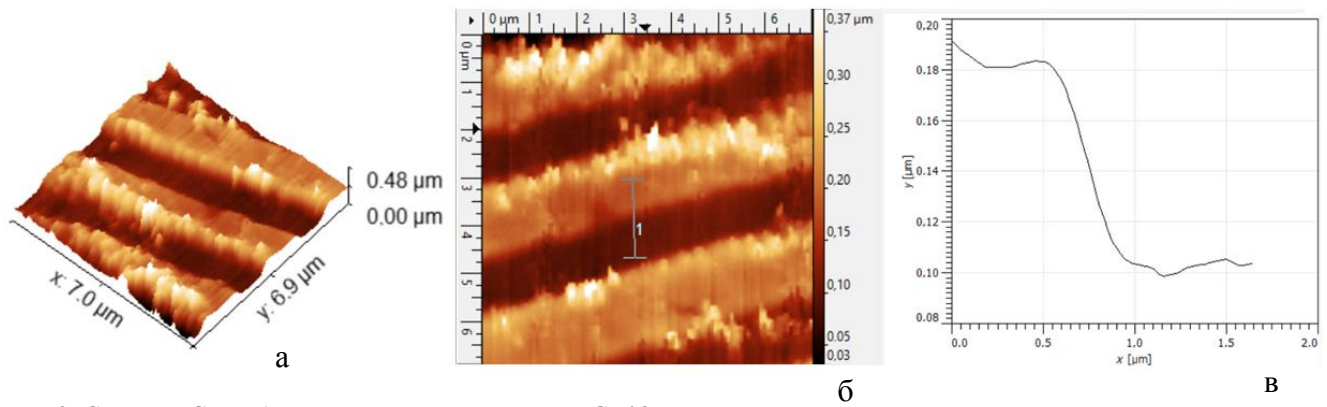


Рис. 9. СМПП DC-изображение реплики решетки TGZ02.

а — 3D-отображение, б — 2D-отображение, в — усредненное поперечное сечение ступеньки (выборка по 20 сечениям)

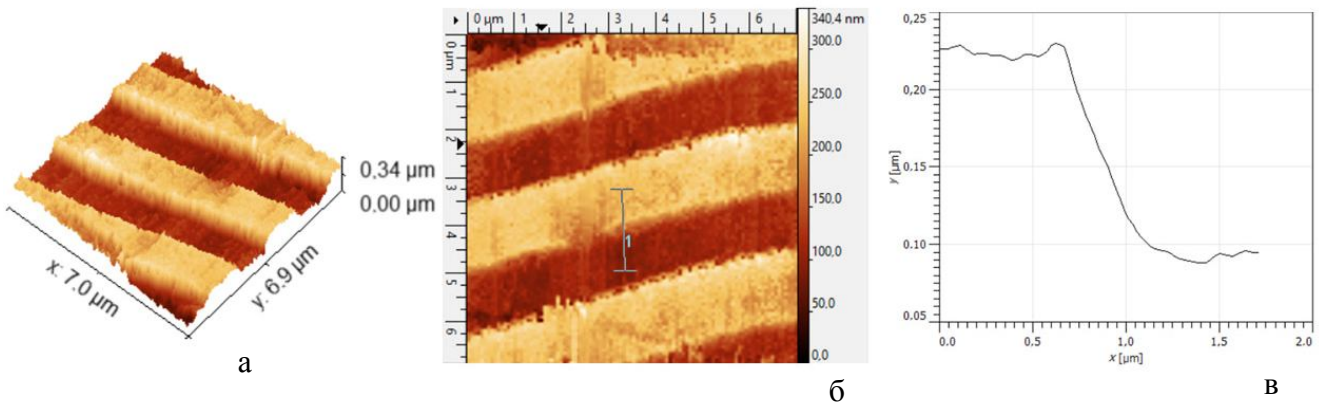


Рис. 10. СМПП hopping-изображение реплики решетки TGZ02.

а — 3D-отображение, б — 2D-отображение, в — усредненное поперечное сечение ступеньки (выборка по 20 сечениям)

На рис. 6, 9, 10 показаны результаты измерения реплики тестовой решетки в различных модах. Исходя из полученных данных при измерении реплики, высота структуры в одних и тех же участ-

ках составила минимальные значение в режиме СМПП постоянного тока, а максимальные при режиме СМПП hopping (табл.).

Табл. Статистические параметры СМПП-изображений тестового образца, полученных в режимах постоянного тока и hopping

Параметр	АСМ решетки (полуконтакт)	АСМ реплики решетки (полу-контакт)	Режим СМПП постоянного тока (DC)	Режим СМПП hopping
Среднее значение высоты ступеньки*, нм	106.0	102.4	78.2	128.9
Средний наклон боковой стенки*, нм	238.0	552.0	452.0	464.0
Шероховатость S_a на плоском участке, нм	5.35	5.98	13.85	9.89

* по усредненным данным на базе выборки из 20 поперечных сечений ступеньки

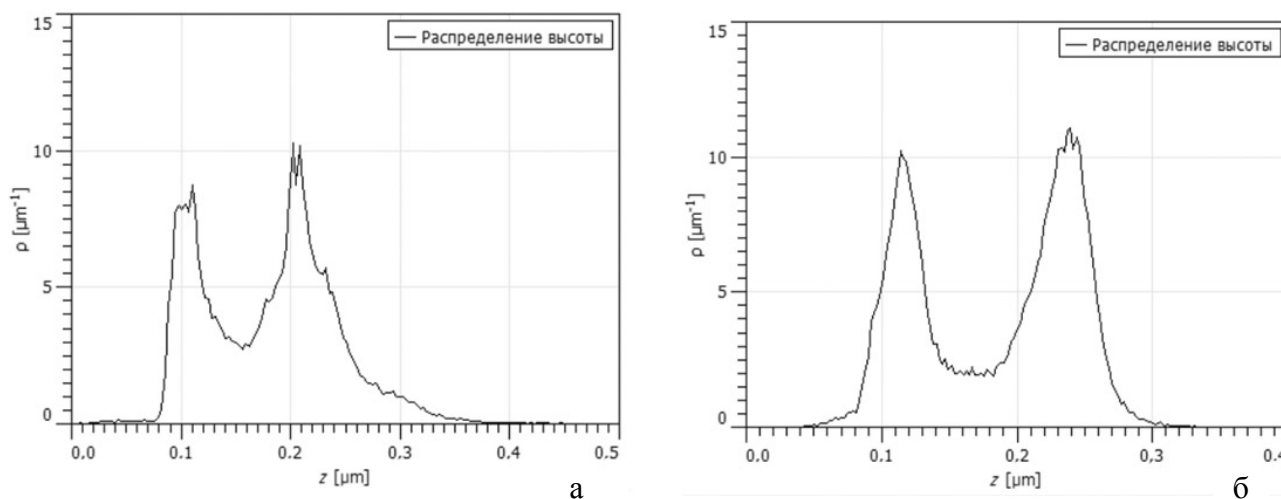


Рис. 11. Гистограммы высот для изображений, полученных в режимах СМИП постоянного тока DC (а) и hopping (б)

Результаты АСМ с решетки TGZ02 и полученной с нее реплики хорошо согласуются с паспортными значениями по высоте и периоду. Стоит отметить, что в связи с неровными краями реплики в некоторых местах высота и ширина наклона ступеньки может варьироваться, для сравнения были найдены наиболее характерные и ровные участки.

В режиме постоянного тока изображение не такое гладкое, как в hopping, видны выбросы по высоте на краях решеток и ровных участках ступенек. Для сравнения изображений СМИП был выбран одинаковый участок. Выявлена общая тенденция к повышению максимальных значений высоты для режимов СМИП (до ~ 350 нм) по сравнению с АСМ (до ~ 200 нм), что связано с протяженными (СМИП DC) и точечными (СМИП hopping) выбросами по координате Z на поверхности. Границы объектов (ширина наклона ступеньки) в обоих режимах СМИП имеют схожие значения ~ 450 нм, что точнее АСМ на реплике (~ 550 нм), но хуже примерно в 2 раза АСМ исходной решетки (~ 250 нм).

На основании данных, в режиме hopping наблюдается как хороший контраст изображения, так и хорошее латеральное разрешение, что видно по изображениям и поперечным сечениям отдельных дорожек решетки, усредненных по 20 линиям. Тем не менее минусом является большое время сканирования в режиме hopping, что в некоторых случаях может привести к влиянию теплового и ионного дрейфа на качество изображения [25, 26].

По данным гистограмм изображений (рис. 8, 11) видно, что разделение на нижний и верхний уровни высот более дифференцировано у режима

hopping с уклоном в большие высоты. В режимах СМИП можно наблюдать два пика, тогда как в режиме АСМ можно выделить три пика (у реплики больше пиков за счет неровности стенки), что может быть связано с наличием локальных областей повышения высоты при сканировании образца. Тем не менее все значения лежат примерно в одной области, соответствующей реальной высоте образца.

Согласно усредненным данным (табл.) разброс шероховатости на плоском участке составляет большие значения для режима СМИП DC, что связано с резкими выбросами высот на границах ступенек. Значения шероховатости решетки и ее реплики в АСМ имеют схожие значения. По сравнению с режимом постоянного тока режим hopping дает как хороший контраст, так и хорошее разрешение СМИП без срывов и участков выбросов по высоте. Это хорошо подтверждают результаты исследования не только неорганических объектов, но и живых клеток (Приложение, рис. П2, П3), для которых режим СМИП является приоритетным благодаря малой инвазивности метода и возможности работать в жидких буферных средах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе представлен и исследован "home-made" — многомодовый прибор СМИП с системой пьезоинерциального перемещения образца на основе пьезоупругого пакета. Предложенная система перемещения обеспечивает прецизионный пошаговый подвод/отвод образца к зонду с диапазоном перемещения ~ 5 мм и средним минимальным шагом ~ 150 нм, что достаточно для

точного измерения кривой подвода и выбора рабочей точки без повреждения стеклянной НП. Диапазон плавных перемещений образца при получении СМИП-изображений составлял ~ 7 мкм в направлении, перпендикулярном к поверхности образца, и 30×30 мкм в плоскости образца. Для получения СМИП-изображений были изготовлены методом теплового разогрева с последующим механическим разрывом нанопипетки из боросиликатного стекла с минимальным внутренним радиусом ~ 50 нм и углом заострения вершины $\sim 3\text{--}5^\circ$. Проведено сравнение режимов постоянного ионного тока, переменного ионного тока с модуляцией нанозазора "зонд – образец" и режима перескока с использованием полимерной реплики, снятой с тестовой твердотельной калибровочной решетки (набор периодически расположенных борозд высотой 110 ± 2 нм и периодом 3 ± 0.05 мкм). Обнаружено, что режим модуляции ионного тока

путем модуляции зазора дает более стабильные СМИП-изображения по сравнению с режимом постоянного тока, но завышает значения высоты рельефа. Режим перескока как демонстрирует наиболее стабильные СМИП-изображения, так и достаточно точно отображает рельеф тестового образца, однако требует большего времени сканирования. Тем не менее, выбирая режим перескока, следует учитывать, что при большом времени сканирования может проявиться как тепловой дрейф, так и дрейф, вызванный изменением потенциала на AgCl-электродах. Таким образом, выбор оптимального режима СМИП должен определяться конкретными условиями и задачами эксперимента. Результаты работы могут быть полезны как при проектировании СМИП, так и при решении задач в области нанодиагностики мягких нативных биологических объектов в жидкой среде, в исследовании ионообменных процессов и т.п.

ПРИЛОЖЕНИЕ

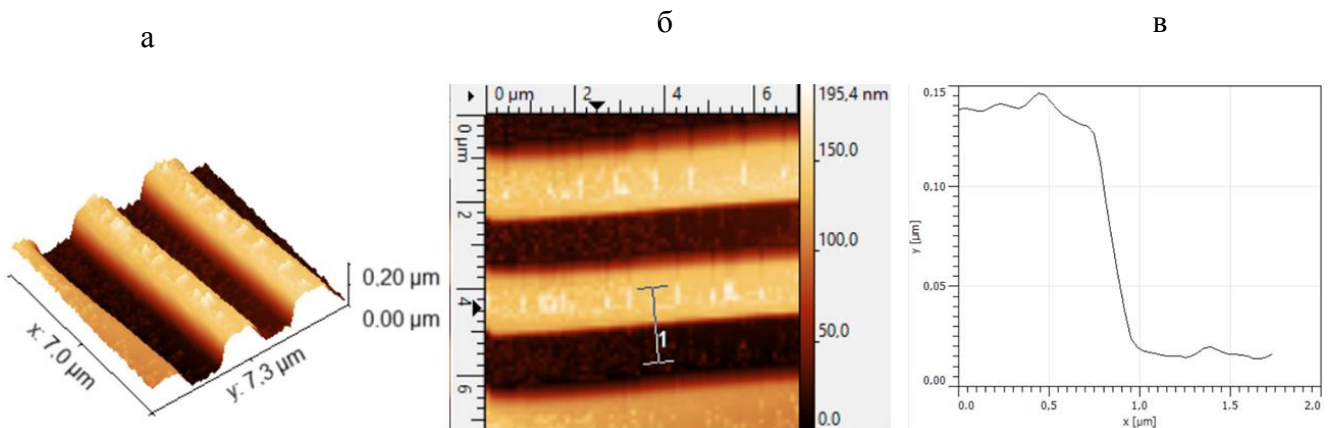


Рис. П1. АСМ-изображение решетки TGZ02.

а — 3D-отображение, б — 2D-отображение, в — усредненное поперечное сечение ступеньки (выборка по 20 сечениям)

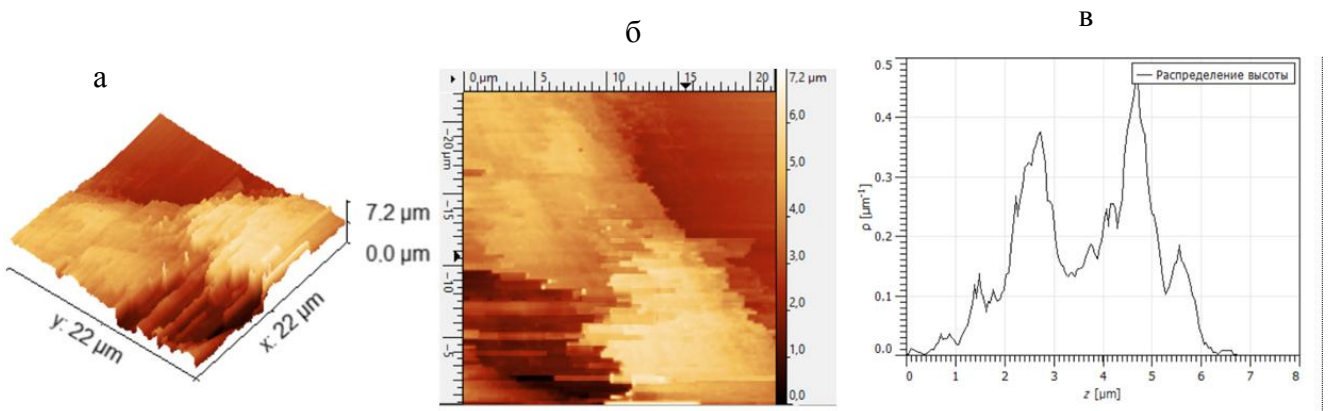


Рис. П2. СМИП DC-изображение клеток CHO (Chinese hamster ovary).

а — 3D-отображение, б — 2D-отображение, в — гистограмма высот

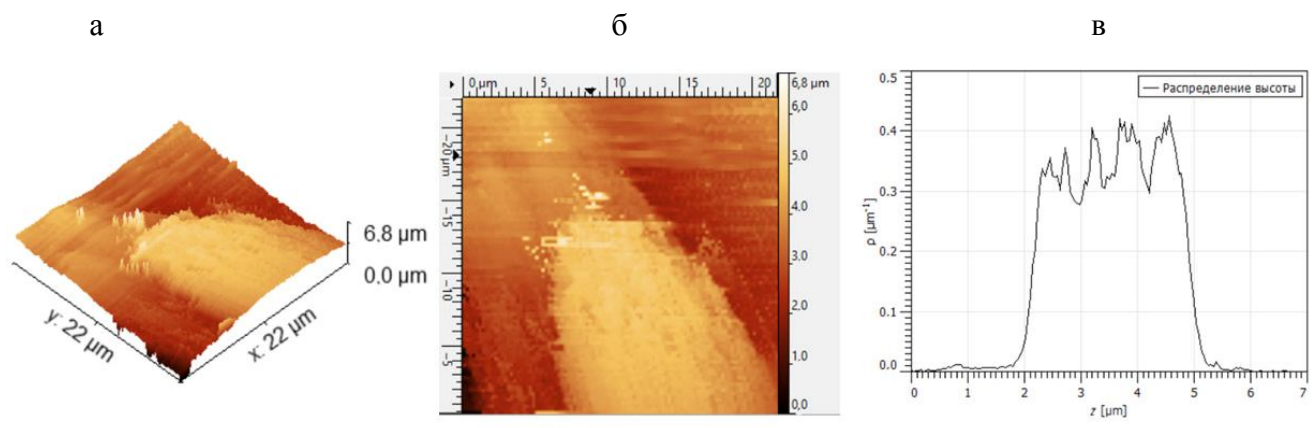


Рис. 13. СМИП hopping-изображение клеток CHO (Chinese hamster ovary). а — 3D-отображение, б — 2D-отображение, в — гистограмма высот

Работа выполнена при поддержке государственного задания № FFZM-2022-0008 (тема № 22 542,089) Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hansma P.K., Drake B., Marti O., Gould S.A., Prater C.B. The scanning ion-conductance microscope // *Science*. 1989. Vol. 243, is. 4891. P. 641–643. DOI: 10.1126/science.2464851
- Happel P., Dietzel I.D. Backstep scanning ion conductance microscopy as a tool for long term investigation of single living cells // *J. Nanobiotechnol.* 2009. Vol. 7, no. 7. DOI: 10.1186/1477-3155-7-7
- Morris C.A., Chen C.-C., Baker L.A. Transport of redox probes through single pores measured by scanning electrochemical-scanning ion conductance microscopy (SECM-SICM) // *Analyst*. 2012. Vol. 137, no. 13. P. 2933–2938. DOI: 10.1039/C2AN16178H
- Zhang P., Aydemir N., Alkaisi M., Williams D.E., Travas-Sejdic J. Direct writing and characterization of three-dimensional conducting polymer PEDOT arrays // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. Vol. 10, no. 14. P. 11888–11895. DOI: 10.1021/acsmi.8b02289
- Pellegrino M., Orsini P., Pellegrini M., Baschieri P., Dinelli F., Petracchi D., Tognoni E., Ascoli C. Integrated SICM-AFM-optical microscope to measure forces due to hydrostatic pressure applied to a pipette // *Micro & Nano Lett.* 2012. Vol. 7, no. 4. P. 317–320. DOI: 10.1049/mnl.2011.0670
- Zhukov M.V., Sapozhnikov I.D., Golubok A.O., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Komissarenko F.E., Lukashenko S.Y. Scanning ion-conductance and atomic force microscope with specialized sphere-shaped nanopipettes. // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2017. Vol. 917. Id. 042022.
- Page A., Perry D., Unwin P.R. Multifunctional scanning ion conductance microscopy // *Proc. R. Soc. A*. 2017. Vol. 473, is. 2200. DOI: 10.1098/rspa.2016.0889
- Novak P., Li Ch., A. I., Shevchuk Yuri, Korchev E. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy // *Nature methods*. 2009. Vol. 6, no. 4. P. 279–281.
- Sa N., Baker L.A. Experiment and Simulation of Ion Transport through Nanopipettes of Well-Defined Conical Geometry // *Journal of The Electrochemical Society*. 2013. Vol. 160, no. 6. P. 376–381. DOI: 10.1149/2.128306jes
- Wei Ch., Bard A.J., Feldberg S.W. Current rectification at quartz nanopipet electrodes // *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69, is. 22. P. 4627–4633. DOI: 10.1021/ac970551g
- Li P., Liu L., Yang Y., Zhou L., Wang D., et al. Amplitude modulation mode of scanning ion conductance microscopy // *Journal of Laboratory Automation*. 2015. Vol. 20, no. 4. P. 457–462.
- Li P., Liu L., Wang Y., Yang Y., Zhang Ch., Li G. Phase modulation mode of scanning ion conductance microscopy // *Applied physics letters*. 2014. Vol. 105, is. 5. Id. 053113. DOI: 10.1063/1.4891571
- Klenerman D., Shevchuk A., Novak P., Korchev Y.E., Davis S.J. Imaging the cell surface and its organization down to the level of single molecules // *Philos. Trans. R. Soc., B*. 2013. Vol. 368, is. 1611. Id. 20120027. DOI: 10.1098/rstb.2012.0027
- Zhuang J., Cheng L., Liao X., Zia A.A., Wang Zh. A fuzzy control for high-speed and low-overshoot hopping probe ion conductance microscopy // *Rev. Sci. Instrum.* 2020. Vol. 91, is. 3. Id. 033703. DOI: 10.1063/1.5114642
- Wang Z., Zhuang J., Gao Z., Liao X. A fast scanning ion conductance microscopy imaging method using compressive sensing and low-discrepancy sequences // *Rev. Sci. Instrum.* 2018. Vol. 89, is. 11. Id. 113709. DOI: 10.1063/1.5048656
- Zhuang J., Jiao Y., Mugabo V. A new scanning mode to improve scanning ion conductance microscopy imaging rate with pipette predicted movement // *Micron*. 2017. Vol. 101. P. 177–185. DOI: 10.1016/j.micron.2017.07.007

17. Gesper A., Hagemann P., Happel P. A low-cost, large field-of-view scanning ion conductance microscope for studying nanoparticle–cell membrane interactions // *Nanoscale*. 2017. Vol. 9, is. 37. P. 14172–14183. DOI: 10.1039/C7NR04306F
18. Watanabe S., Ando T. High-speed XYZ-nanopositioner for scanning ion conductance microscopy // *Appl. Phys. Lett.* 2017. Vol. 111, is. 11. Id. 113106. DOI: 10.1063/1.4993296
19. Jung G.E., Noh H., Shin Y.K., Kahng S.J., Baik K.Y., Kim H.B., Cho N.J., Cho S.J. Closed-loop ARS mode for scanning ion conductance microscopy with improved speed and stability for live cell imaging applications // *Nanoscale*. 2015, Vol. 7, is. 25. P. 10989–10997. DOI: 10.1039/C5NR01577D
20. Shevchuk A., Tokar S., Gopal S., Sanchez-Alonso J.L. *et al.* Angular approach scanning ion conductance microscopy // *Biophysical Journal*. 2016. Vol. 110, is. 10. P. 2252–2265. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.04.017
21. Rheinlaender J., Schäffer T.E. Image formation, resolution, and height measurement in scanning ion conductance microscopy // *Journal of applied physics*. 2009. Vol. 105, is. 9. Id. 094905. DOI: 10.1063/1.3122007
22. Rheinlaender J., Schäffer T.E. An accurate model for the ion current-distance behavior in SICM allows for calibration of pipet tip geometry and tip-sample distance // *Analytical Chemistry*. 2017. Vol. 89, is. 21. P. 11875–11880. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03871
23. Sapozhnikov I., Gorbenko O., Felshtyn M., Zhukov M., Golubok A. SPM-unit combined with optical microscope objective // *AIP Conf. Proc.* 2019. Vol. 2064, is. 1. Id. 020003. DOI: 10.1063/1.5087659
24. Sapozhnikov I.D., Gorbenko O.M., Felshtyn M.L., Zhukov M.V., Golubok A.O. Features of combining of scanning probe microscopy with optical and scanning electron microscopy // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019. Vol. 699. Id. 012040. DOI: 10.1088/1757-899X/699/1/012040
25. Zhukov M.V., Lukashenko S.Yu., Sapozhnikov I.D., Golubok A.O. Creation and study of liquid nanojunction using SPM-base technology // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2020. Vol. 1695. Id. 012167. DOI: 10.1088/1742-6596/1695/1/012167
26. Zhukov M.V., Lukashenko S.Yu., Sapozhnikov I.D., Felshtyn M.L., Gorbenko O.M., Golubok A.O. Scanning ion-conductance microscope with modulation of the sample position along the Z coordinate and separate Z-axial and lateral (X, Y) scanning // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2021. Vol. 2086. Id. 012074. DOI: 10.1088/1742-6596/2086/1/012074

**Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург**

Контакты: Жуков Михаил Валерьевич,
cloudjyk@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 03.10.2022

MULTIMODE SCANNING ION CONDUCTION MICROSCOPE WITH PIEZO-INERTIAL MOVING SYSTEM

**M. V. Zhukov, S. Yu. Lukashenko, I. D. Sapozhnikov, M. L. Felshtyn,
O. M. Gorbenko, S. V. Pichakhchi, A. O. Golubok**

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia

A scanning ion conductance microscope (SICM) has been developed, operating in several modes: DC mode, current modulation mode, and hopping mode. SICM employs a piezoelectric-inertial movement system. The nanoprobe, in the form of glass nanopipettes with an internal radius of $r \sim 50$ nm, have been created and tested. The current-voltage characteristics $I(V)$ and current dependences on the distance between the probe and the sample $I(z)$ (approach/withdrawal curves) were measured. Images of a polymeric test object with a periodic structure and a biological object (CHO cell) were obtained, their quality was assessed, and the features of the SICM operation in various modes are discussed. The multimode SICM provides non-destructive, non-contact visualization of soft objects in a liquid conducting medium with nanometer spatial resolution in various measuring modes and can be used in biology, cytology, electrochemistry, and medicine when studying inorganic soft objects, biological objects in buffer media, etc.

Keywords: nanopipette, probe, electrode, ion conductivity, scanning probe microscopy, scanning ion-conductance microscope

INTRODUCTION

Scanning ion conductance microscopy (SICM) is a type of scanning probe microscopy (SPM) using a glass nanopipette (NP) with an internal aperture radius of ~ 50 – 100 nm as a probe. SICM was proposed in 1989 by Paul Hansma [1] and found wide application in cytology [2], electrochemistry [3], as well as micro- and nanoscale surface modification [4]. For a more accurate selection of the location on the sample, SICM is usually combined with optical microscopy. It is also interesting to combine SICM with atomic force microscopy (AFM) [5, 6]. In SICM, the sample is fixed to the bottom of a Petri dish filled, like the pipette, with NaCl solution. Silver chloride electrodes are placed inside the pipette and Petri dish, one of which is grounded, and voltage is applied to the other. The SICM measures the magnitude of the ion current flowing through the pipette between the AgCl electrodes during mechanical scanning with the probe relative to the sample or the sample relative to the probe. The basis of the operation of the SICM, as well as the basis of the operation of all SPM devices, is the dependence on the distance between the probe and the sample, with the difference that, unlike all other types of SPM, in the SICM, the signal decreases with a decrease in the gap between the probe and the surface under study, and not increases. The ion current is transformed on the surface of AgCl-electrodes into an electronic current, which is converted, using a current-voltage converter (CVC), into an electric voltage, and fed to the input of the tracking system (TC), which, using a feedback loop (FL), controls the position of

the probe above the sample surface during precision mechanical scanning.

When using SICM, there are three main scanning modes: DC mode [1], AC mode [7] and the mode of successive approach-withdrawal cycles, also known as "hopping" [8].

In DC mode, the tracking system maintains a constant value of the ion current flowing through the tip of the nanopipette, continuously adjusting the scanner coordinate along the Z axis. In DC mode, the ion current increases when moving away from the surface and decreases when approaching the sample surface. At a distance up to the sample exceeding the NP radius, the system records the saturation current I_{sat} , which is limited only by the aperture and resistance of the NP itself. When choosing the operating current, it is usually set to a value $\sim (0.1$ – $10)\%$ less than the saturation current. The DC mode is characterized by lower sensitivity compared to other scanning techniques. This is due to the fact that stable operation in DC mode is achieved only when the NP tip is far enough from the studied surface at a distance comparable to the size of its aperture [8]. At such distances, the slope of the working area on the approach curve is small, which reduces the sensitivity and spatial resolution of the method.

The performance of the tracking system depends on the gain of the feedback loop, which includes the transfer function of the SICM contact. In the case of DC mode, it is determined by the steepness of the dependence of the ion current on the distance between the NP and the sample. In DC mode, the operating point on the lead curve is located in the $I \sim 0.1 \cdot I_{\text{sat}}$ re-

gion, where a change in slope steepness is observed for the $I(z)$ dependence. So, the feedback operates in a nonlinear mode, which leads to phase distortions and different rates of processing of hollows and protrusions on the surface. In this case, there may be a loss of contact, sticking of the NP in a soft sample, or breakage of the glass NP in hard areas. This usually happens when scanning for long periods of time. Based on these features, soft samples with a fairly smooth surface relief are preferably measured in DC mode.

Also, the DC mode is very susceptible to electrochemical potential drifts on silver chloride electrodes; this leads to ion current instability and electronic noise, which limit the efficiency of this mode. Also, this method turns out to be very unstable under temperature fluctuations. DC image quality can be affected by conductivity nonlinearity and the concentration of ions of the same sign near the outlet of the pipette [9]. Charging the pipette tip during scanning [10] can cause ion current surges. In addition, the response of the probe during scanning can depend both on the change in the distance between the pipette tip and the surface under study as well as on local ion activity, which complicates the problem of interpreting the measurement results.

Two methods of operation are used in SICM in the AC mode: by modulating either the gap in the direction of the Z axis or the bias voltage, an alternating current I_{ac} arising at the modulation frequency is released. The AC amplitude is used as the TS input signal and is kept constant during scanning. When the gap is modulated, the amplitude of the alternating current is proportional to the derivative $dI(z)/dz$, making this mode more sensitive to surface relief change. When the bias voltage is modulated, the amplitude of the variable component in the current is proportional to the derivative $dI(V)/dV$, i.e., inversely proportional to the resistance of the SICM contact, and decreases as the NP approaches the sample surface. When connecting TS, it should be taken into account that in the first case of current modulation, the amplitude of the variable component of the signal increases when the NP approaches the sample, and in the second case it decreases. The ability to operate with a zero constant bias value minimizes the electrical impact on the item being studied, which is crucial for native cells. This is a benefit of the AC mode with bias voltage modulation.

Also, AC mode practically does not depend on drifts of electrochemical potential on electrodes, since the amplitude of the modulated signal does not depend on the saturation current, and occurs only at distances of the order of the nanopipette radius.

In the AC mode, the signal was found to be much more stable [7] and more sensitive to the position of the nanopipette near the surface compared to the DC

mode response. [11] presents the AC mode with voltage modulation, when capacitance compensation was carried out to eliminate the "capacitive effect" during pipette charge. [12] describes a mode in which both resistive and capacitive components of ion current are separated using synchronous detection, and TS maintains a constant amplitude of the resistive component of current oscillating in phase with alternating voltage applied to AgCl electrodes. This mode is less sensitive than the DC mode to electronic noise and drift, the latter being due to electrochemical reactions occurring on the electrodes, since the direction of chemical reactions periodically reverses, which increases the retention time of the AgCl layer on the Ag surface. However, the mode of modulating the ion current through bias voltage modulation still gives poor image quality when scanning samples with developed surface topography.

All the above mentioned SICM modes are based on a uniform measurement algorithm with continuous operation of the TS during scanning. The most stability is demonstrated by the mode of successive approach-withdrawal cycles [8] with the following algorithm:

- NP having lateral coordinates $(X1, Y1)$ is retracted along the Z coordinate to the initial position away from sample at $I = I_{sat}$;
- the operating value of the pedestal current is set, for example, $I = 0.1 \cdot I_{sat}$, the approach of the NP to the sample is turned on, and the ion current near the surface equal to the pedestal value is captured by the TS, and the coordinate $Z1$ of the scanner position is stored;
- NP is set to the initial position $I = I_{sat}$ and moves to the next point $(X1, Y1)$, the cycle repeats.

In the hopping mode, feedback can operate in both the DC and AC modes. This technique bypasses the disadvantages associated with DC and AC modes and allows the visualization of sample images with well-developed relief and high spatial resolution.

However, the hopping mode also has drawbacks due to the low imaging speed due to the constant up-and-down movement of the pipette [13, 14]. There are several ways to increase scanning speeds. One approach involves reducing the number of pixels during scanning by performing fast pre-scanning and sampling the scan process based on "compressed" probing [15], which increases the speed of image acquisition, but negatively affects image quality. In particular, pre-scanning is not suitable for complex or rough surfaces. The second approach shortens the imaging time by reducing unnecessary probe motion by predicting the height at the next image point. A hybrid scan combining DC and hopping modes can produce a high resolution image in a short time using height prediction at the next image point [16]. However, in the case of highly rough surfaces, these methods can still cause

the pipette to collide with the sample surface. The third approach is based on increasing the speed of the pipette in the Z-direction due to reducing the response time of the piezoelectric drive to the input signal by improving the mechanical properties of the piezoelectric drive [17], increasing its natural resonance frequency [18] or using advanced control algorithms [19]. Solutions are also known when the pipette is at an angle to the surface under study [20], which makes it possible to visualize micro- and nanostructures with steep side surfaces. Finally, to adequately interpret the obtained SICM-images, it is necessary to correctly understand the physicochemical processes that determine the nature of SICM images. Thus, an important part of the SMPS is the computer simulation of the current density distribution in the pipette hole and in the area of contact with the sample [21].

This paper presents the multimode measuring head of the SICM device. In the proposed design, in order to improve its compactness, increase the frequency of mechanical resonance, and increase the stability of the approach and scanning process, a piezo actuator is used, in which, with the help of one piezo-package, both step-by-step "piezoinertial" movement of the sample is carried out to capture the ion current before scanning, and smooth movement to stabilize the SICM signal during scanning. The paper describes the technology for manufacturing probes in the form of glass nanocapillaries and presents their SEM images, as well as presents and discusses test SICM images obtained in various measurement modes.

SETUP DESCRIPTION AND RESEARCH METHODS

As probes, nanopipettes (NPs) made of borosilicate glass are produced on the PMP-107 pipette extractor (Micro Data Instrument Inc., USA) using the thermal melting and breaking of glass capillaries with an initial outer diameter of ~ 1.2 mm and an inner diameter of ~ 0.6 mm. A "hand-made" SICM measuring head and a control/data acquisition unit were used. The measuring head was located on a table with active vibration protection Halcyonics Nano-20 (Accordion GmbH, Germany). A scanning electron microscope (SEM) Inspect (FEI, USA) was used to control the quality of the pipettes. After selecting the optimal thermal drawing parameters for borosilicate preforms, the minimum internal radius of the pipette tip was ~ 50 nm with a tip sharpening angle of $\sim 3\text{--}5^\circ$ (Fig. 1).

Fig. 1. Images of NPs in a scanning electron microscope (SEM).
a — isometric view, б — side view

Chlorinated silver AgCl filaments were used as electrodes, and 0.9 wt. % NaCl aqueous saline was used as a buffer. To reduce acoustic noise, thermal drifts, and electromagnetic interference, a protective grounded cap was used. Measurements were carried out at a temperature of about 21 °C and humidity of about 30–40%. It should be noted that the internal radius of the pipette can be estimated not only by direct measurement in the SEM, but also by indirect measurement through the conductivity of the pipette in a conductive solution according to the current-voltage characteristic (CVC) [22] (Fig. 2, a). So, knowing the resistance and NP taper angle, its effective radius can be estimated using the formula (1):

$$R_p = \frac{1}{\pi \cdot \sigma \cdot r_i \cdot \tan \alpha}, \quad (1)$$

where σ is the electrical conductivity, r_i is the inner radius of the pipette, α is the angle of the pipette tip.

The calculated and measured NP radii have a good correlation. It is worth noting that with small pipette sizes, over time, an increased concentration of ions of the same sign may form at its apex, which leads to the effect of "rectifying" the current (Fig. 2, б). Since the current can fluctuate at the same voltage over time when scanning samples, this effect is typically regarded as parasitic, but in some circumstances it can be beneficial (for example, in microfluidics and nanoelectronics to control charged particles in the stream or create "liquid" diodes).

Fig. 2. Typical values of NP CVC in a solution of 0.9% wt. NaCl.

a — during the first immersion of the NP into the solution; б — the effect of "rectification" of the current [7], associated with the accumulation of ions of the same sign near the pipette (ion blockade). CVC are plotted according to repeatedly measured curves

Fig. 3 shows the diagram of the measuring head with a feedback loop, which ensures operation of the SICM in DC, AC modes with modulation of the distance between the probe and the sample, and in the hopping mode.

Fig. 3. Scheme of the measuring head of the multimode SICM device with a feedback loop.

1 — NP with electrolyte; 2 — sample; 3 — Petri dish with electrolyte; 4 — AgCl electrodes; 5 — piezo package; 6 — titanium rod; 7 — carriage; 8 — piezo-tube; 9 — piezoelectric element; CVC — current-to-voltage converter; SD — sync detector; DU — differential amplifier; U_0 — the reference voltage during scanning; \int — integrator; HVA — high-voltage amplifier; П1, П2 — switches

In the gap between probe 1 in the form of a still glass NP filled with electrolyte, and a sample 2 at the bottom of the Petri dish 3 also filled with electrolyte, an ion current flows under the action of the bias voltage V applied between the AgCl electrodes 4. The step-by-step approach of pipette 1 and sample 2 is carried out in a "piezo-inertial" way using a piezo actuator based on piezopacket 5 (P885.1, Physical Instruments), controlled by asymmetric pulses with sharp ($\sim 10 \mu\text{s}$) and smooth ($\sim 200 \text{ms}$) edges.

Asymmetric voltage pulses (Fig. 4) are connected to the piezoelectric package when contact I of the P_1 switch is closed. One end of the piezoelectric package 5 is glued to a fixed base, and a titanium rod 6 is glued to the opposite end, to which the carriage 7 is pressed with the piezotube 8 installed on it. The piezotube 8 provides scanning in the plane (XY), on which the Petri dish 3 with the sample 2 is fixed.

Fig. 4. Step-by-step measurement of up/down movement of piezo-inertial actuator along Z (a) coordinate and histogram of step value distribution during upward movement (б)

The high voltage amplifiers controlling the scanning are not shown in the diagram. The scanning range in the XY plane is $30 \times 30 \mu\text{m}$. Under the action of a sharp edge, the piezoelectric package 5 is sharply stretched or compressed depending on the sign of the electric voltage. In this case, the inertia force acting on the carriage 7 is greater than the friction force. As a result, the carriage 7 slides along the surface of the guide rod 6 along the axis Z. Under the action of the smooth front of the control pulse, the inertia force is smaller than the friction force, and no slippage occurs. The direction of movement of the carriage up or down can be changed by changing the sign of the control voltage or by swapping the front and rear fronts of the control pulses. As shown in [23, 24], using MPS, it is possible to accurately measure the steps of the piezo-inertial actuator.

Fig. 4 shows the results of step-by-step measurement of the movement of the piezo-inertial actuator 5, 6, 7 up/down along the Z coordinate (Fig. 4, a) and the histogram (Fig. 4, б) of the distribution of the step value when moving up, respectively. It can be seen that the average step during the upward movement of the sample is $\sim 100 \text{nm}$ while the maximum step value is 145nm . The corresponding values for the downward movement of the carriage 7 are approximately twice as large, which is due to the action of gravity. The range of movement of the sample along the Z coordinate is $\sim 5 \text{mm}$. Such parameters of the piezo-inertial actuator provide a reliable "no contact" approach of the probe to the sample, which is fundamen-

tal to the SICM, since the glass nanopipet is usually destroyed in the slightest collision with a solid substrate.

To switch from the approach-withdrawal mode to the smooth scanning mode, piezoelectric package (5) is connected to the FL when switch Π_1 contact (II) is closed and contact I is open. Now the piezoelectric package 5 is controlled by a smoothly varying voltage from the HVA, the carriage 7 is held by friction forces and does not slip along the rod 6, and the piezoelectric package 5 provides smooth movement of the sample along the Z coordinate, performing the function of the TS actuator. The smooth scanning range is $\sim 7 \mu\text{m}$.

In the nanometer gap between the end of the pointed capillary and the sample, an ion current I_i flows, turns into an electron current on the AgCl electrodes, and is converted into an electric voltage proportional to the ion current $U = R \cdot I_i$ using a current-to-voltage converter (CVC), which is an operational amplifier with feedback resistance R . In our case, $R \sim 0-100 \text{M}\Omega$. In DC mode, the contacts of the Π_2 switch are in position II. The voltage U is compared on a differential amplifier with the reference voltage U_0 and fed to the integrator input, and then to the input of a high-voltage amplifier connected to a piezoelectric package that moves sample 2 along the Z axis so that a constant value of the ion current flowing through the pipette is maintained during scanning. In the described device, the AC mode is carried out by modulating the gap between the sample and the probe using a piezoelectric element, which swings the pipette with a given amplitude and frequency of $\sim 1 \text{kHz}$.

To enter the AC mode, an alternating voltage is connected to the piezoactuator in the form of a bimorph piezoelectric element, as well as to one of the synch detector inputs. The contacts of switch P_2 are transferred to position I, and the alternating signal resulting from the modulation of the gap at the output of the CVC is additionally passed through the sync detector, the reference signal of which is the voltage swinging the piezoelectric element 9. As a result, during scanning, the TS maintains a constant amplitude of the alternating signal at the modulation frequency. This circuit can also support the voltage-modulated AC mode. In this case, the alternating voltage is connected not to the piezoactuator 9, but through the input resistance of the CVC operational amplifier to the AgCl electrode in the Petri dish.

In hopping mode, the FL is switched to either DC or AC operation. Before moving the sample to the new coordinate, the sample is first retracted from the probe along the Z coordinate to a certain distance by changing the reference voltage at the inverted input of the differential amplifier (DA) in the FL, then the sample is transferred to a new position using the scanner 8, after which the previous value of the reference voltage U_0 is restored in the FL. As a result, the TS captures a signal equal to the reference value of the U_0

at the new point of the sample. To reduce the time of approaching the NP to the sample, a fast approach system is used (Fig. 5).

Fig. 5. Diagram of fast approach system.
1 — repeater, 2 — comparator, 3 — trigger, 4 — opto-relay, 5 — piezopacket

This system is connected to the CVC output in DC mode. The signal from CVC is supplied to the repeater 1 to increase the input resistance, and then gets compared by the comparator 2 with the set voltage. As the pipette approaches the sample, the current decreases, so the setup voltage is set slightly less than the voltage corresponding to the current flowing through the NP at a distance from the sample. When the current decreases slightly as it approaches the sample, the comparator is triggered, and trigger 3 is activated. Trigger includes opto-relay 4, which shunts piezoelectric package 5. When switching over the mode of operation from input to scanning, the trigger is reset, the opto-relay opens, and it does not interfere with scanning.

RESULTS AND DISCUSSION

As a test sample for testing various SICM modes, a polymer replica was taken from a test calibration grating TGZ02 (NT-MDT, Russia), which is a set of periodically arranged grooves with a height of 110 ± 2 and a period of $3 \pm 0.05 \mu\text{m}$ long (see Appendix, Fig. II). Ethylene vinyl acetate molten ($78\text{--}80 \text{ }^\circ\text{C}$) polymer was applied to the solid surface of the TGZ02 calibration grating. Then, after cooling, mechanical pressing (stamping) and peeling of the polymer from the surface of the initial calibration grating. The AFM image of the replica of the TGZ02 grating is shown in Fig. 6, the height distribution histograms — in Fig. 7.

Fig. 6. AFM image of the TGZ02 grating replica.
a — 3D display, б — 2D display, в — average cross section of the stair step (20 section sampling)

Fig. 7. Histograms of height distribution for AFM image of TGZ02 grating (a) and grating replica (б)

Typical values of current dependence on the distance $I(z)$ are shown in Fig. 8. Values are normalized to the saturation current in the case of DC mode (SICM DC) and to the maximum signal value at a specified Z near the surface in the case of gap modulation mode (SICM AC).

Fig. 8. Approach curve in SICM modes.
Hopping in DC mode and AC modulation mode

It can be seen that the approach curve measured in the DC mode shows a decrease in current as the gap between the probe and the sample decreases, while in the AC mode with gap modulation, an inverse relationship is observed. This is due to the fact that by modulating Z and measuring the amplitude of the variable component in the ion current using a synchronous detector, we actually measure a signal proportional to dI/dZ , i.e., a derivative of the approach curve, the values of which increase as the gap decreases.

Figs. 6, 9, 10 show the results of measuring the replica of the test grid in various modes. Based on the data obtained during the measurement of the replica, the height of the structure in the same areas was the minimum value in the SICM DC mode, and the maximum in the SICM hopping mode (Tab.).

Fig. 9. SICM DC image of the TGZ02 grating replica.
a — 3D display, б — 2D display, в — average cross section of the stair step (20 section sampling)

Fig. 10. SICM hopping image of a replica of the TGZ02 grating.
a — 3D display, б — 2D display, в — average cross section of the stair step (20 section sampling)

Tab. Statistical parameters of SICM images of the test sample obtained in DC and hopping modes

The AFM results from the TGZ02 grid and the replica obtained from it are well consistent with the passport values for height and period. It is worth noting that due to the uneven edges of the replica in some places, the height and width of the slope of the step can vary, for comparison the most characteristic and even areas were found.

In DC mode, the image is not as smooth as in hopping, there are height outliers at the edges of the grating and flat sections of steps. The same area was selected to compare the SICM images. A general trend was revealed to increase the maximum altitude values for SMID modes (up to $\sim 350 \text{ nm}$) compared to AFM (up to $\sim 200 \text{ nm}$), due to extended (SICM DC) and point (SICM hopping) outliers along the Z coordinate on the surface. Object boundaries (step slope width) in both SICM modes have similar values $\sim 450 \text{ nm}$, which is more accurate than the AFM on a replica

(~ 550 nm), but about 2 times worse than the AFM of the original grating (~ 250 nm).

Based on the data, in the hopping mode, both good image contrast and good lateral resolution are observed, as can be seen from the images and cross sections of individual grating tracks averaged over 20 lines. Nevertheless, the hopping mode downside is the long scanning time, which in some cases can lead to the influence of thermal and ion drifts on image quality [25, 26].

The histograms of the images (Fig. 8, 11) show that the separation into the lower and upper height levels is more differentiated in the hopping mode, with a bias toward higher heights. Two peaks can be observed in SICM modes, whereas in AFM mode, three peaks can be distinguished (the replica has more peaks due to wall irregularity), which may be due to the presence of local areas of height increase during scanning of the sample. Nevertheless, all values lie approximately in the same region, corresponding to the actual height of the sample.

Fig. 11. Height histograms for images obtained in SICM DC (a) and hopping (б) modes

According to the averaged data (Tab.), the roughness spread in the flat region implies large values for the SICM DC mode, which is associated with sharp height outliers at the boundaries of the steps. The roughness values of the grating and its replica in AFM are similar. Compared to the DC mode, the hopping mode gives both good contrast and good SICM resolution without disruption or regions of height outliers. This is well confirmed by the results of the study of not only inorganic objects, but also living cells (Appendix, Fig. П2, П3), for which the SICM mode is a priority due to the low invasiveness of the method and the ability to work in liquid buffer media.

CONCLUSION

Thus, the work presents and investigates a "home-made" multimode SICM device with a piezo-inertial sample movement system based on a piezoelectric package. The proposed movement system provides precise incremental approach/retraction of the sample to the probe with a movement range of ~ 5 mm and an average minimum step of ~ 150 nm, which is sufficient for accurate measurement of the approach curve and selection of the operating point without damaging the glass NP. The range of smooth movements of the sample during the acquisition of SICM images was ~ 7 μ m in a direction perpendicular to the sample surface, and 30×30 μ m in the sample plane. To obtain SICM images, a borosilicate glass nanopipettes with a minimum inner radius of ~ 50 nm and a tip sharpen-

ing angle of ~ 3 – 5° were fabricated by thermal heating followed by mechanical rupture. The modes of direct ion current, and alternating ion current with modulation of the probe-sample nanogap were compared with the hopping mode using a polymer replica taken from the test solid-state calibration grating (a set of periodically arranged grooves of 110 ± 2 nm high and a period of 3 ± 0.05 μ m). It has been found that the ion current modulation by gap modulation produces more stable SICM images compared to the DC mode, but overestimates the relief heights. The hopping mode demonstrates both the most stable SICM images and accurately displays the relief of the test sample, but requires more scanning time. Nevertheless, when choosing the hopping mode, it should be taken into account that both thermal drift and drift caused by a change in the potential at the AgCl electrodes can appear over a long scan time. Thus, the selection of the optimal SICM mode should be determined by the specific conditions and objectives of the experiment. The results of the work can be useful both in the design of SICM and in solving problems in the field of nanodiagnostics of soft native biological objects in a liquid medium, in the study of ion-exchange processes, etc.

APPENDIX

Fig. П1. AFM image of the TGZ02 grating. a — 3D display, б — 2D display, в — average cross section of the stair step (20 section sampling)

Fig. П2. SICM DC image of CHO (Chinese hamster ovary) cells. a — 3D display, б — 2D display, в — height histogram

Fig. П3. SICM hopping image of CHO (Chinese hamster ovary) cells. a — 3D display, б — 2D display, в — height histogram

REFERENCES

1. Hansma P.K., Drake B., Marti O., Gould S.A., Prater C.B. The scanning ion-conductance microscope. *Science*, 1989, vol. 243, is. 4891, pp. 641–643. DOI: 10.1126/science.2464851
2. Happel P., Dietzel I.D. Backstep scanning ion conductance microscopy as a tool for long term investigation of single living cells. *J. Nanobiotechnol*, 2009, vol. 7, no. 7. DOI: 10.1186/1477-3155-7-7

3. Morris C.A., Chen C.-C., Baker L.A. Transport of redox probes through single pores measured by scanning electrochemical-scanning ion conductance microscopy (SECM-SICM). *Analyst*, 2012, vol. 137, no. 13, pp. 2933–2938. DOI: 10.1039/C2AN16178H
4. Zhang P., Aydemir N., Alkaisi M., Williams D.E., Travas-Sejdic J. Direct writing and characterization of three-dimensional conducting polymer PEDOT arrays. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2018, vol. 10, no. 14, pp. 11888–11895. DOI: 10.1021/acsami.8b02289
5. Pellegrino M., Orsini P., Pellegrini M., Baschieri P., Dinelli F., Petracchi D., Tognoni E., Ascoli C. Integrated SICM-AFM-optical microscope to measure forces due to hydrostatic pressure applied to a pipette. *Micro & Nano Lett.*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. 317–320. DOI: 10.1049/mnl.2011.0670
6. Zhukov M.V., Sapozhnikov I.D., Golubok A.O., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Komissarenko F.E., Lukashenko S.Y. Scanning ion-conductance and atomic force microscope with specialized sphere-shaped nanopipettes. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2017, vol. 917, Id. 042022. DOI: 10.1088/1742-6596/917/4/042022
7. Page A., Perry D., Unwin P.R. Multifunctional scanning ion conductance microscopy. *Proc. R. Soc. A*, 2017, vol. 473, is. 2200. DOI: 10.1098/rspa.2016.0889
8. Novak P., Li Ch., Shevchuk A.I., et al. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nature methods*, 2009, vol. 6, no. 4, pp. 279–281. DOI: 10.1038/nmeth.1306
9. Sa N., Baker L.A. Experiment and Simulation of Ion Transport through Nanopipettes of Well-Defined Conical Geometry. *Journal of The Electrochemical Society*, 2013, vol. 160, no. 6, pp. 376–381. DOI: 10.1149/2.128306jes
10. Wei Ch., Bard A.J., Feldberg S.W. Current rectification at quartz nanopipet electrodes. *Anal. Chem.*, 1997, vol. 69, is. 22, pp. 4627–4633. DOI: 10.1021/ac970551g
11. Li P., Liu L., Yang Y., Zhou L., Wang D., et al. Amplitude modulation mode of scanning ion conductance microscopy. *Journal of Laboratory Automation*, 2015, vol. 20, no. 4, pp. 457–462. DOI: 10.1177/2211068215573191
12. Li P., Liu L., Wang Y., Yang Y., Zhang Ch., Li G. Phase modulation mode of scanning ion conductance microscopy. *Applied physics letters*, 2014, vol. 105, is. 5, Id. 053113. DOI: 10.1063/1.4891571
13. Klenerman D., Shevchuk A., Novak P., Korchev Y.E., Davis S.J. Imaging the cell surface and its organization down to the level of single molecules. *Philos. Trans. R. Soc., B*, 2013, vol. 368, is. 1611, Id. 20120027. DOI: 10.1098/rstb.2012.0027
14. Zhuang J., Cheng L., Liao X., Zia A.A., Wang Zh. A fuzzy control for high-speed and low-overshoot hopping probe ion conductance microscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 2020, vol. 91, is. 3, Id. 033703. DOI: 10.1063/1.5114642
15. Wang Z., Zhuang J., Gao Z., Liao X. A fast scanning ion conductance microscopy imaging method using compressive sensing and low-discrepancy sequences. *Rev. Sci. Instrum.*, 2018, vol. 89, is. 11, Id. 113709. DOI: 10.1063/1.5048656
16. Zhuang J., Jiao Y., Mugabo V. A new scanning mode to improve scanning ion conductance microscopy imaging rate with pipette predicted movement. *Micron*, 2017, vol. 101, pp. 177–185. DOI: 10.1016/j.micron.2017.07.007
17. Gesper A., Hagemann P., Happel P. A low-cost, large field-of-view scanning ion conductance microscope for studying nanoparticle–cell membrane interactions. *Nanoscale*, 2017, vol. 9, is. 37, pp. 14172–14183. DOI: 10.1039/C7NR04306F
18. Watanabe S., Ando T. High-speed XYZ-nanopositioner for scanning ion conductance microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 2017, vol. 111, no. 11, Id. 113106. DOI: 10.1063/1.4993296
19. Jung G.E., Noh H., Shin Y.K., Kahng S.J., Baik K.Y., Kim H.B., Cho N.J., Cho S.J. Closed-loop ARS mode for scanning ion conductance microscopy with improved speed and stability for live cell imaging applications. *Nanoscale*, 2015, vol. 7, is. 25, pp. 10989–10997. DOI: 10.1039/C5NR01577D
20. Shevchuk A., Tokar S., Gopal S., Sanchez-Alonso J.L. et al. Angular approach scanning ion conductance microscopy. *Biophysical Journal*, 2016, vol. 110, no. 10, pp. 2252–2265. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.04.017
21. Rheinlaender J., Schäffer T.E. Image formation, resolution, and height measurement in scanning ion conductance microscopy. *Journal of applied physics*, 2009, vol. 105, is. 9, Id. 094905. DOI: 10.1063/1.3122007
22. Rheinlaender J., Schäffer T.E. An accurate model for the ion current-distance behavior in SICM allows for calibration of pipet tip geometry and tip-sample distance. *Analytical Chemistry*, 2017, vol. 89, is. 21, pp. 11875–11880. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03871
23. Sapozhnikov I., Gorbenko O., Felshtyn M., Zhukov M., Golubok A. SPM-unit combined with optical microscope objective. *AIP Conf. Proc.*, 2019, vol. 2064, is. 1, Id. 020003. DOI: 10.1063/1.5087659
24. Sapozhnikov I.D., Gorbenko O.M., Felshtyn M.L., Zhukov M.V., Golubok A.O. Features of combining of scanning probe microscopy with optical and scanning electron microscopy. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2019, vol. 699, Id. 012040. DOI: 10.1088/1757-899X/699/1/012040
25. Zhukov M.V., Lukashenko S.Yu., Sapozhnikov I.D., Golubok A.O. Creation and study of liquid nanojunction using SPM-base technology. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2020, vol. 1695, Id. 012167. DOI: 10.1088/1742-6596/1695/1/012167
26. Zhukov M.V., Lukashenko S.Yu., Sapozhnikov I.D., Felshtyn M.L., Gorbenko O.M., Golubok A.O. Scanning ion-conductance microscope with modulation of the sample position along the Z coordinate and separate Z-axial and lateral (X, Y) scanning. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2021, vol. 2086, Id. 012074. DOI: 10.1088/1742-6596/2086/1/012074