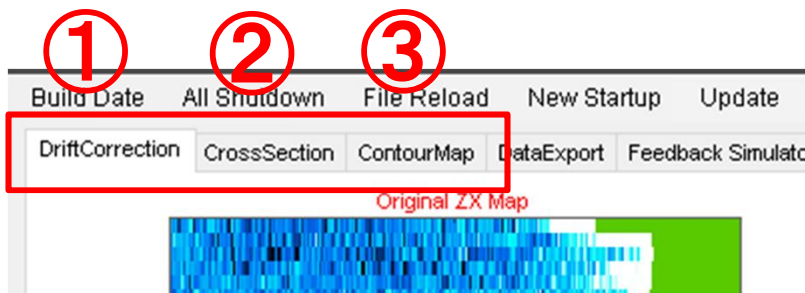


Quick Guide for UMEX 3D Force Map Viewer

1. 全体の手順



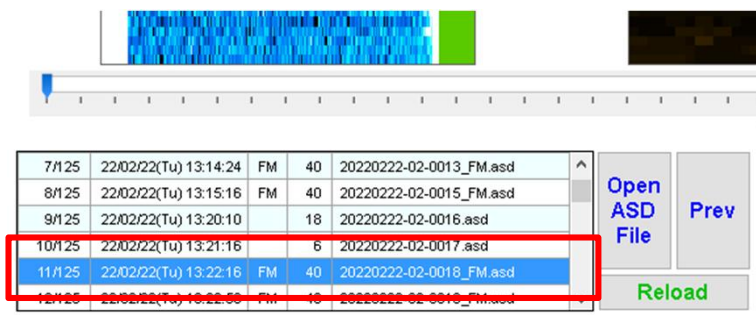
①DriftCorrection

②CrossSection

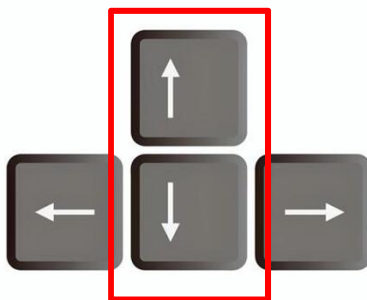
③ContourMap

の順に解析を行う

2. ASDファイルのOpen



ASDファイルをソフトウェア
上にD&Dして取り込む



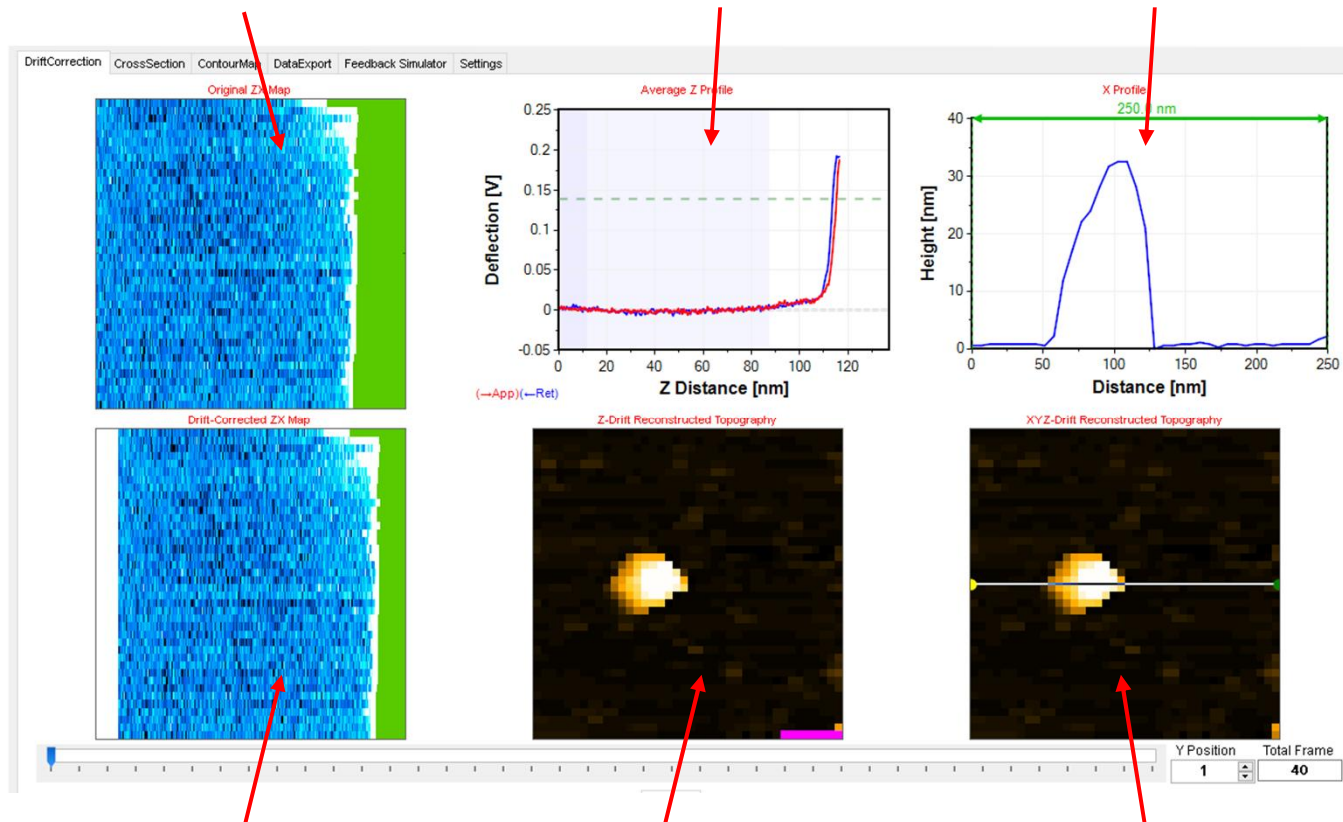
オープンするASDファイルは、どのタブページ
上でも、キーボードの縦矢印キーで変更するこ
とができる。

3. DriftCorrection

Z方向のドリフト補正前
ZXスライスイメージ

ZXスライスイメージ上の
全平均フォースカーブ

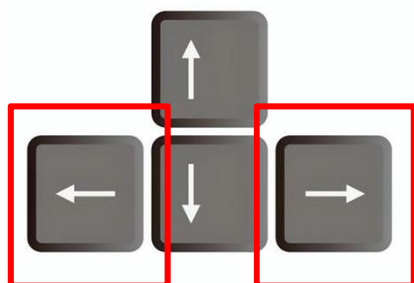
下のラインで示した位置で
取得したラインプロファイル



Z方向のドリフト補正後の
ZXスライスイメージ

Triggerのかかった位置
の再構成像

シアー補正後の再構成
像



スライダーは、キーボードの横矢印
キーで変更することができる。

Setting1 Setting2 Setting3

Background Subtract (Deflection)

	Degree	Range(%)	LineByLine
1	0th	10	Full
2	1st	75	Fit-1st

Degree:

次数が大きいほど、曲がったラインを真っすぐに補正できるが、近傍領域までおかしくなってしまうことがあるので、できる限り小さな次数を設定する。

1段階目は必ず0thをかけておき、2段階目で1stか2ndで補正する

概要:

フォースカーブの遠方領域を多項式フィットし、差し引くことでフラットにする。二段階でフィットを行うが、基本的には、1段階目の設定は変える必要がなく、2段階目の設定のみデータに応じて変更する。

Range:

多項式フィットする範囲を設定する。探針-試料間相互作用が生じていない領域を設定する

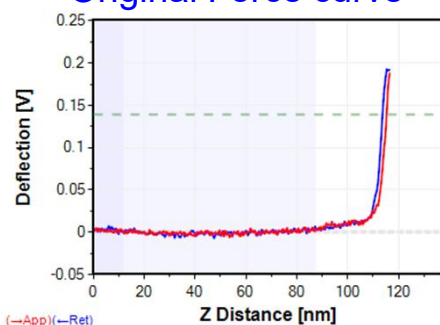
LineByLine:

X方向の各ピクセルでの位置依存性を差し引くかどうかを設定する。

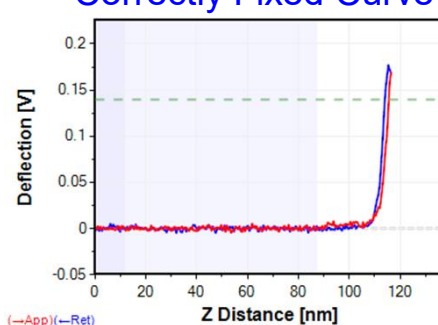
Fit-1st – Fit- 3rd: 各ラインごとに多項式フィットした後に、それぞれのラインでの多項式係数を1～3次式でフィットする

Full: 各ラインごとに独立してZ方向に多項式フィットを行う。0次だとFullで問題無いが、1stや2ndを使った時に、フィットがうまくいかない場合があるので、その場合、他のモードを試す。

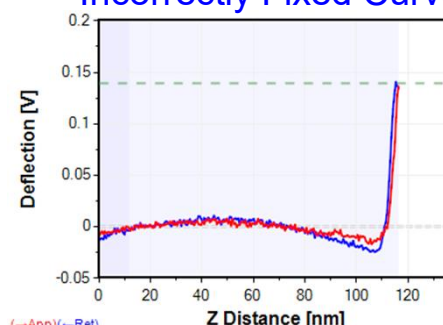
Original Force curve



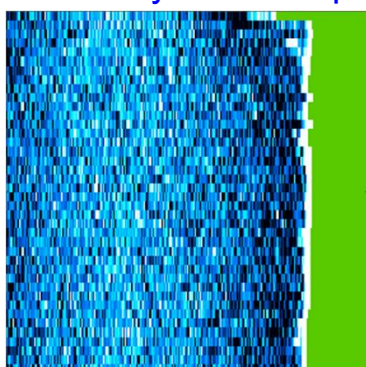
Correctly Fixed Curve



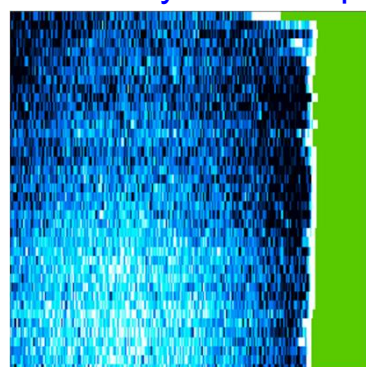
Incorrectly Fixed Curve



Correctly Fixed Map



Incorrectly Fixed Map



Cautions

Setting1 Setting2 Setting3

Background Subtract (Deflection)

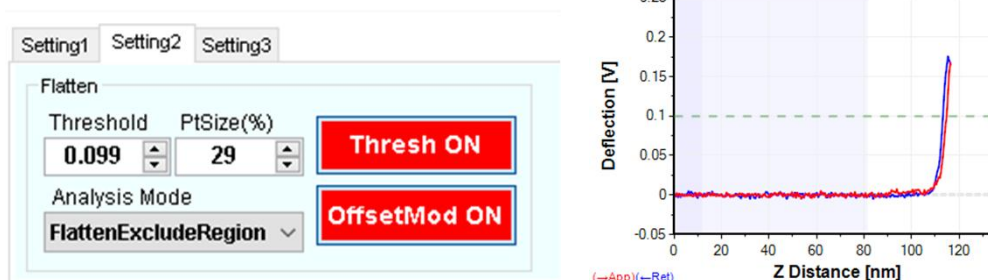
	Degree	Range(%)	LineByLine
1	0th	10	Full
2	1st	75	Fit-1st

常にFullに固定

極力、Full以外に設定する。ノイズが多すぎてうまくいかない場合にのみ例外的にFullに設定する

Background Subtractで、#1のLineByLineはFullで固定して使用する。一方で、#2のLineByLineをFullに設定すると、一見するとうまく設定できているように見えても、凹凸の大きな表面上のデータを解析する際に、エネルギー散逸などのデータにアーティファクトが乗るケースがある。フォースカーブの変動が多すぎて、Full以外ではうまくBackgroundが平坦にならない場合のみ、Fullに設定する。その場合には、うまく解析できているか、フォースカーブを確認する必要がある。

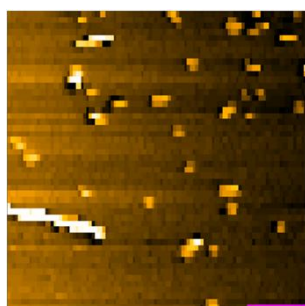
Flatten



Flattenで、Thresholdで設定した高さが同じになるように、Line-by-Lineで揃える。

Thresholdの位置は、フォースカーブ上に緑破線として表示される。通常は、最大Deflection値の50%程度に設定しておけば良い。

Tilt Correction



左図のような傾きを補正するためには、Tilt Correctionを用いる。

傾きが全Xラインで同じ場合には、Globalに設定して手動でOffsetを調節する。

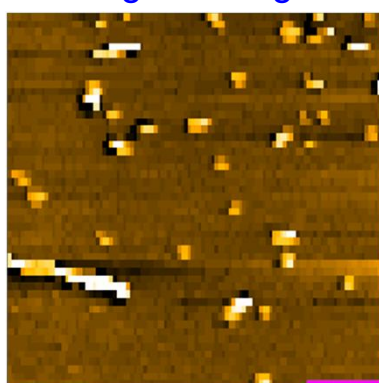
ドリフトが激しくライン毎に大きくずれる場合には、LineByLineを設定して自動でライン毎に補正を行う。

LineByLineでTiltCorrectionを行うと、下図左のように、粒子のあるラインにアーティファクトが生じてしまう場合がある。この場合には、Triggerイメージ上をマウスでドラッグすることで、TiltCorrectionの排除領域を設定する。マウスホイールで描画レンジを設定することができる。Deleteしたい場合には、右クリックやミドルクリックを用いる。

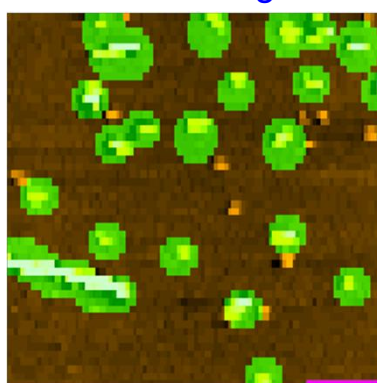
これにより、下図右のように基板表面をフラットにすることができる。

この操作を毎回やるのは面倒なので、できる限り、ドリフトのない条件化で測定を行うことが望ましい。

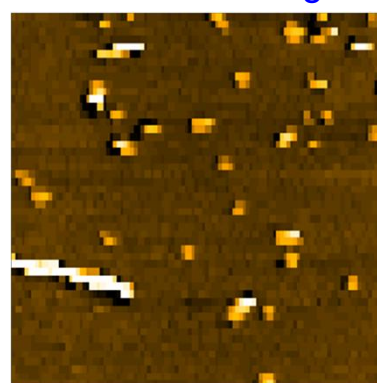
Original Image



Exclude Region



Hide Exclude Region



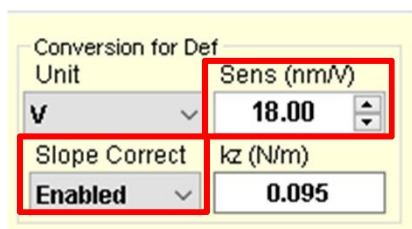
4. CrossSection



変位検出感度や、FFTスペクトルのフィッティングにより取得したばね定数(kz)はASDファイル内に保存されており、Brownian Infoに表示される。通常、これらの値を変更する必要はない。予め別の測定で、マイカなどの固い表面上でフォースカーブを取得し、Sensitivityを求めておき、デフォルト値として保存しておく。

高速AFMでは、DeflectionをSum値で規格化したものを使用するため、カンチレバーによって感度は大きく変動しない。

SignalConditionerのQuotientを3に設定している場合には、10～15 nm/Vになる。



固いマイカ表面が露出している場合には、得られた3DフォースマップデータからSensitivityが求められるため、事後の計測は必要ない。

表面全体が柔らかい分子が覆われている場合には、実験終了後にマイカを劈開しなおして、同じカンチレバーを使ってSensitivityを求める必要がある。



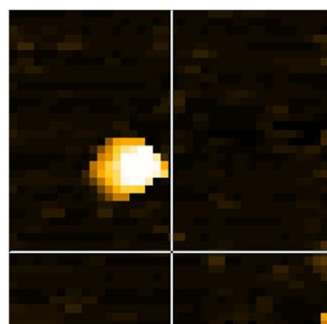
イメージ上の十字線を移動するとフォースカーブの取得位置を設定することができる。

これを分子のないマイカ表面上に設定する。

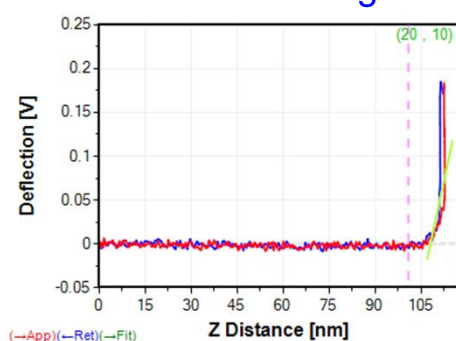
Slope CorrectをEnabledにするとSens(nm/V)で設定した値がフォースカーブに反映されるようになる。

フォースカーブの表面近傍の傾きがまっすぐになるようにSens(nm/V)を調節する。

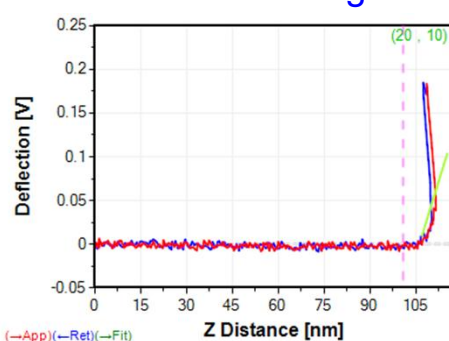
BrownianInfoに表示された、Sensとkzとの比率によって、補正されたkzが下のボックスに表示される。



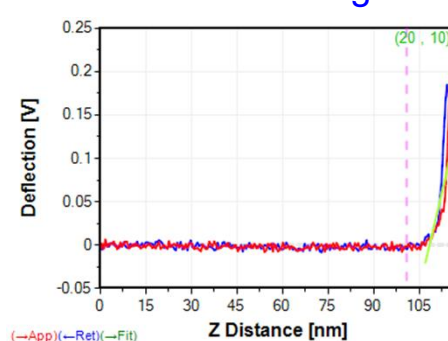
Good Setting



Bad Setting



Bad Setting



定量的な解析時には
Disabledにする

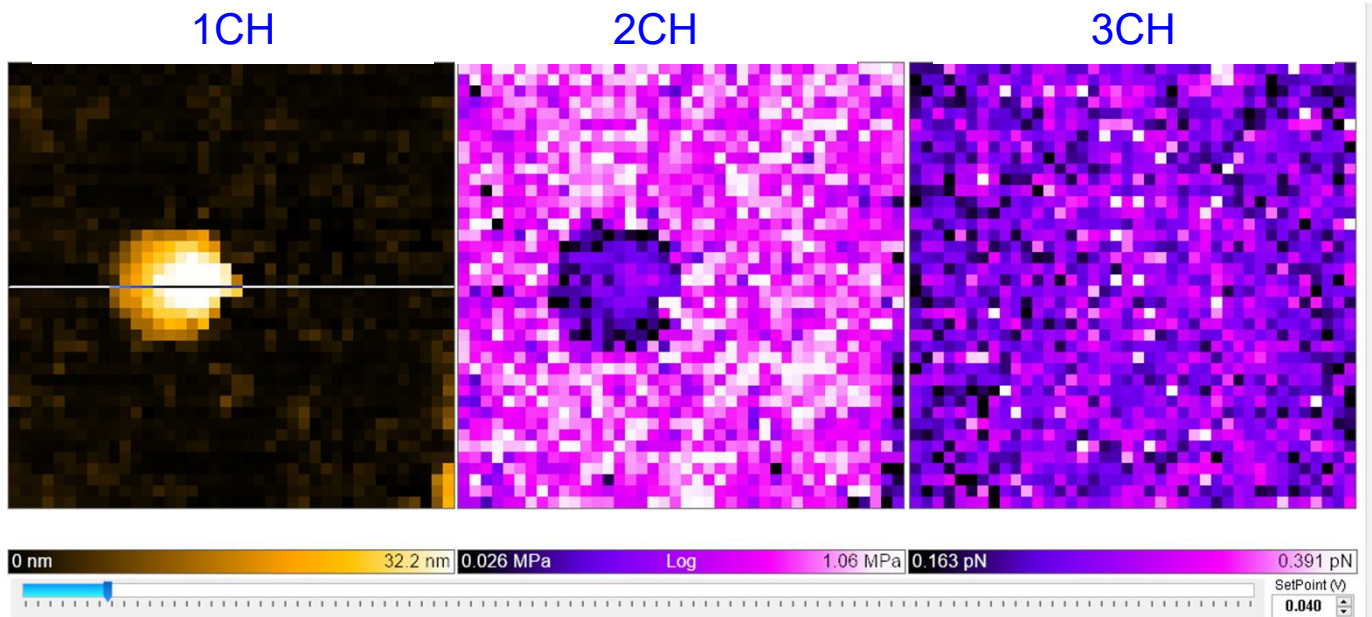


ガウシアンスムージングをかけるとデータの見た目は綺麗になるが、ヤング率の定量性は損なわれるため、定量評価をしたい場合には、無効にした方がよい。

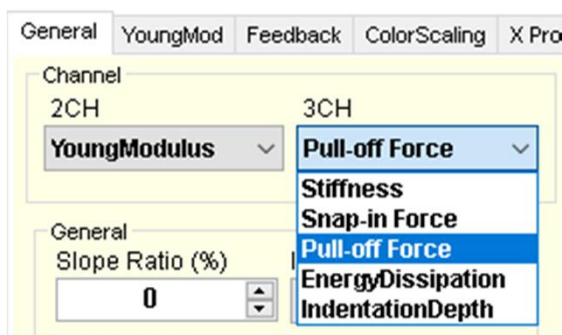
Cautions

SmoothingのXYを有効にすると、横方向のフォースカーブ間で平均がかかる。そのため、ステップ近傍や分子のエッジにおいて、隣り合うフォースカーブの間で表面位置が大きく異なる場合、試料から離れた位置に隣のラインの斥力領域が表れてしまい、定量評価の妨げになることがある。そのため、通常の定量的な解析の場合には、Disabledに設定しておき、XYZマップを可視化した場合にのみ、この機能を有効化する。Zだけは設定しても問題がないが、大きな値を設定すると解析に影響を与えるので、極力Disabledにしておく。

5. ContourMap

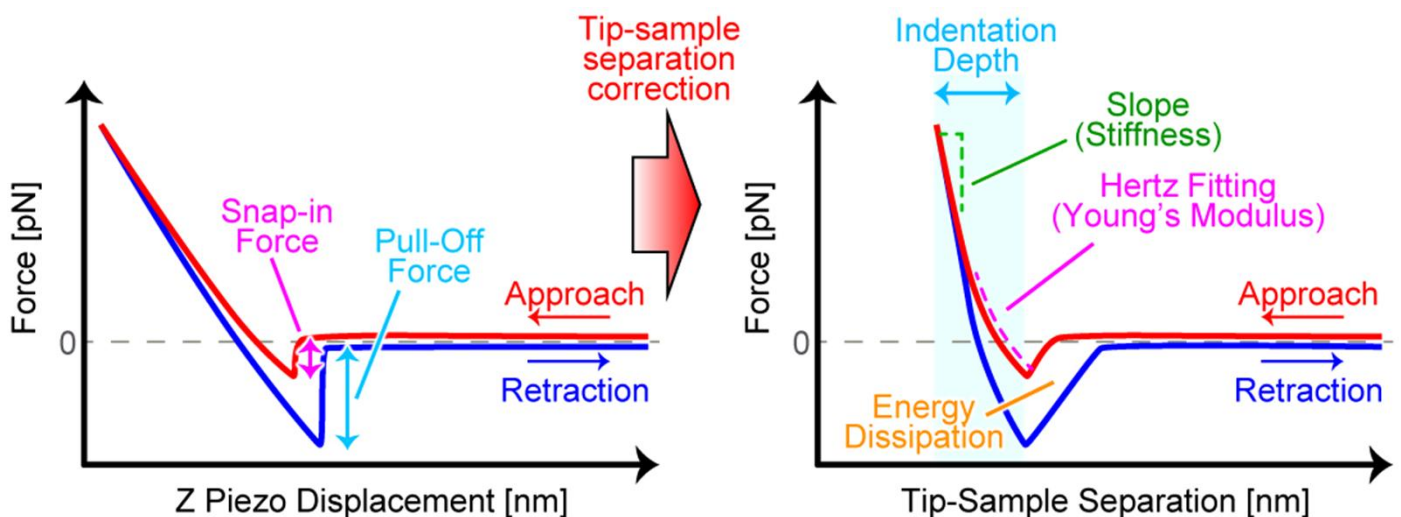


1CH: DeflectionのContourMapが表示される。
使用するSetPointを下のスライドで設定する



2CH:
YoungModulus以外を設定
する必要は無い

3CH:
Stiffness
Snap-in Force
Pull-off Force
Energy Dissipation
Indentation Depth
の中から選択する



Young's Modulus (Pa):

物体の固さを反映した物理量。物質固有の物性値であるため、異なる形状・材質のものとも比較することができる。ただし、探針曲率半径や、分子の形状などのパラメータに依存して変化するため、これらのパラメータを厳密に測定する必要がある。

フォースカーブの立ち上がり領域に、Hertzモデルの理論式を最小二乗法によりフィッティングすることで、ヤング率を求める。理論式として、Hertzモデルの他に、JKRモデルやDMTモデルがある。JKRやDMTモデルの場合、ヤング率だけでなく、凝着エネルギーも同時に求めることができる。JKRはソフトマテリアル、DMTはハードマテリアルに適している。Hertzモデルは、球や円柱構造など様々なモデルに適用できるため、今のところ、Hertzモデルしか導入していない。

Stiffness (N/m):

物体をばねとして見た時の固さを反映した物理量。ヤング率はフォースの立ち上がり位置でのみフィットを行うが、Stiffnessは更に深く探針を押し込んだ位置でのスロープから算出される。ヤング率が物質固有の物性値であるのに対し、Stiffnessは試料や探針の形状なども含めトータルでの固さを表すため、同じ形状のものでしか比較はできない。

ウイルスや細胞、Exosomeなど、ヤング率が一様ではない中空構造の試料の固さを求めるために用いられることが多い。ただし、Thin-Shell Modelを用いれば、中空構造であっても、ヤング率が求めることができるが、細胞全体の固さではなく、膜の固さを求めるため、何を知らたいかで使い分ける必要がある。

Snap-in Force (N):

アプローチのフォースカーブにおけるjump-to-contactの大きさ。Van der Waals力や電気二重層力（静電気力）の大きさをマップすることができる。また、探針が分子を貫通し破壊した時に発生するブレイクスルーフォースを見積もるためにも用いられる。液中測定では、Van der Waals力や静電気力は電解質により遮蔽されるため、ブレイクスルーフォースを見積もるために用いられることが多い。

Pull-Off Force (N):

リトラクト時のフォースカーブにおけるjump-offの大きさ。試料表面が粘着性を調べるためや、抗体抗原反応の破断力 (rupture force) やエネルギーランドスケープを求めるためなどに用いられる。

Energy Dissipation (J):

アプローチとリトラクト時のフォースカーブを探針-試料間距離で積分し、それらの差分値を計算したもの。フォースカーブのヒステリシスを反映する。フォースカーブ1サイクルの中でどれだけエネルギーが損失したかを見積もることができる。Pull-Off Forceと同様に粘着性や結合エネルギーを見積もるために用いられる。

Indentation Depth (m):

フォースカーブの立ち上がりから、終点までの距離を計算したもの。柔らかい表面だと探針は試料深くまでめり込むが、固い表面だとほとんどめり込まないため、固さ分布を反映する。

General YoungMod Feedback ColorScaling

Young Modulus1

Unit: MPa LogScale: Enabled

Upper Limit (GPa): 1.0 Fitting Region: Near

Interpolate: Enabled Minimum Point: 15

Unit:

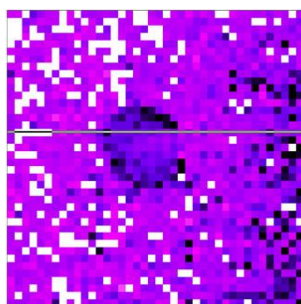
ヤング率の単位を設定する

UpperLimit(GPa):

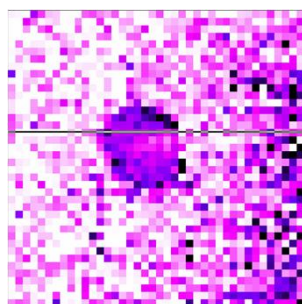
ヤング率の上限を設定する。マイカなどのGpaオーダーのヤング率をもった表面ではわずかなフォースカーブの変化がヤング率に影響を及ぼすため、次図のように、均一なマイカ上でヤング率分布が表れてしまう。

そのため、ヤング率に上限をもたせることで、マイカ上のヤング率に場所依存をもたないようにするためのパラメータ。

UpperLimit
4 GPa



UpperLimit
1 GPa



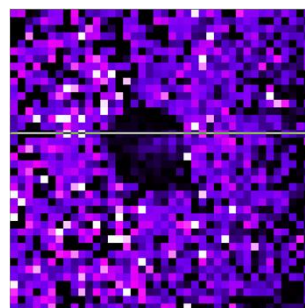
MinimumPoint:

ヤング率フィットを行う距離の最小ポイントを設定する。デフォルト値でうまくフィットできない場合に、数値を調節する

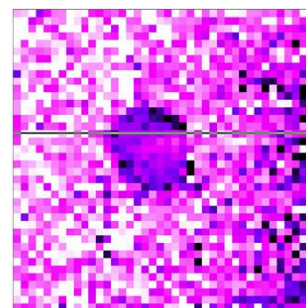
LogScale:

ヤング率はべき乗オーダーで変動するため、Linearスケールで表示するとコントラストが潰れてしまい見づらくなる。通常は、Logスケールを有効にして使用する。

LogScale
Disabled



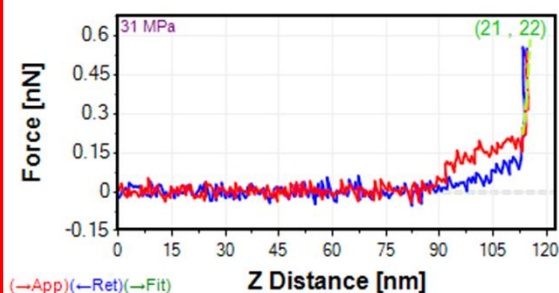
LogScale
Enabled



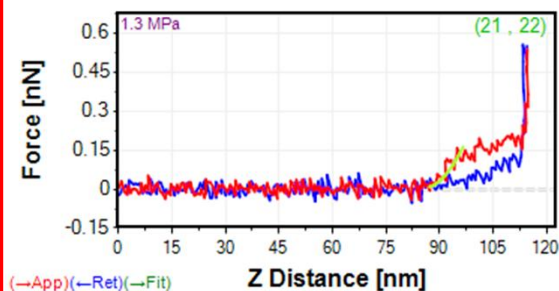
FittingRegion:

通常はNearを設定する。Exosomeや界面活性剤ミセルの場合、次図のように分子集合体の破壊にともないフォースカーブが単調にはならない。そのため、こういったケースで分子集合体の固さを求めるにはFarを設定する必要がある。界面活性剤に覆われた分子そのものの固さを求めるにはNearを設定する必要がある。Thin-Shell Modelを使うと自動でFarに設定される。

Near



Far



Young Modulus (Tip)

Radius (nm) Poisson Ratio
10.0 0.50

Young Modulus (Sample)

Theoretical Model

Hertz(Planar)

Hertz(Planar)

Hertz(Sphere)

Thin-Shell Model

Young's Modulus Setting

探針の曲率半径とポアソン比を設定する

理想的にはDNAなどの既知の分子で調べる必要があるが、実際には、同程度の探針形状でとられたAFMデータのみ
のデータを解析する必要がある

Sampleの形状

Hertz(Planar) : 脂質膜のようにフラットな場合

Hertz(Sphere) : 生体分子のように球状の場合

Thin-Shell Model: Exosomeや細胞などのように中空構造の場合(シェルの厚みや高さ・幅などのパラメータが必要)

参考文献:

https://en.wikipedia.org/wiki/Contact_mechanics

$$F_{\text{Hertz}} = \frac{4E^*}{3} R^{1/2} \delta^{3/2},$$

$$R = R_{\text{tip}} \quad \dots \text{PlanarSample}$$

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_s^2}{E_s} + \frac{1-\nu_{\text{tip}}^2}{E_{\text{tip}}}$$

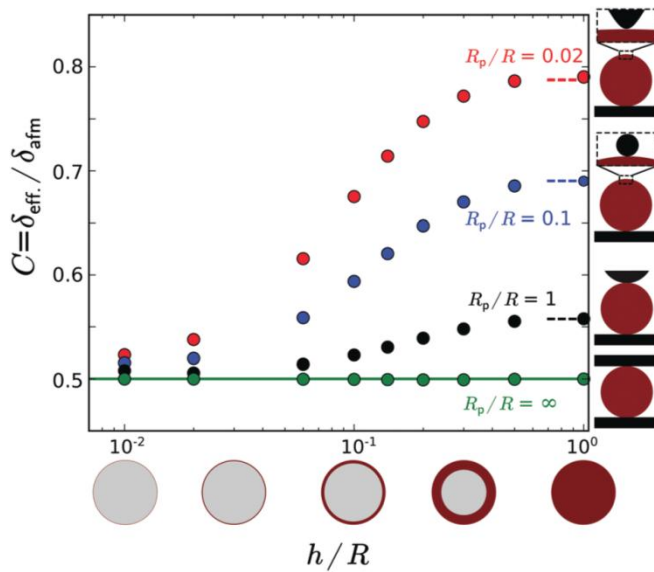
$$\frac{1}{R} = \frac{1}{R_s} + \frac{1}{R_{\text{tip}}} \quad \dots \text{SphericalSample}$$

Thin-Shell Model

$$F_{\text{TSM}} = \frac{4CEt^2}{R_C \sqrt{3(1-\nu^2)}} \delta,$$

$$R_C = \frac{h^2 + w^2 / 4}{2h}$$

Langmuir(2017)の式(3)より



Soft Matter, 13, 1943-1947 (2017)より抜粋

ここで、カプセルシェルの
t: 膜厚(文献によってはdやhとして定義されている)
h: 見かけ上の高さ
w: 見かけ上の幅、
 R_C : 曲率半径
 ν : ポアソン比
C: Bottom Effectの補正係数
を表す。

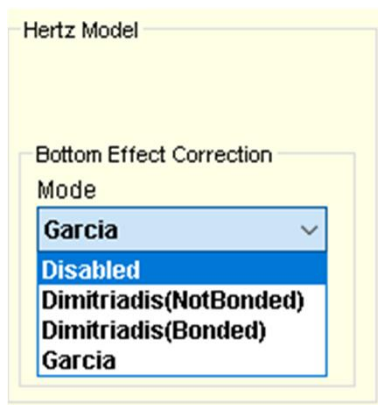
Hertzモデルとは異なり、探針のヤング率や曲率半径、ポアソン比などのパラメータが不要となる。
また、距離に対して3/2乗ではなく線形になる。

CはBottom-effectのCorrection factorを表す。これには解析解がないため、数値計算でしか求めることができない。以下のように、エクソソームの場合には、0.55程度の値をとるため、Langmuir(2017)の文献にならって、0.55の固定値を用いている。

参考文献:

Soft Matter 5, 4944 (2009).
Physical Review Letters 109, 144301 (2012)
Nanoscale 6, 2275-2285 (2014).
Langmuir 33, 5117-5126 (2017)
Soft Matter, 13, 1943-1947 (2017)

Bottom Effect Correction (Reaction force)



分子のサイズに比べてインデンテーション深さが十分小さい場合、物体の変形は接触点近傍に集中するため、Hertz理論が単純に適用できる。一方、分子のサイズの数パーセント以上のインデンテーション深さになる場合には、物体の変形が基板にまで及び、基板からの反作用を受けることで、見かけ上のヤング率が実際よりも高く見積もられてしまう。そのため、固い基板に吸着した分子は、基板の影響を受けて、ヤング率が実際よりも1.5～2倍程度高く見積もられる。この基板の効果を差引くための計算を行うかどうかを設定する。

GarciaモデルはDimitriadisモデルの改良版なので、基本的にはGarciaモデルを使用しておけば問題無い。

Dimitriadisモデルには、bondedとnot-bondedがある。

Bondedは観察対象の膜が基板を固定されており、スリップできない状態を指す。探針が観察対象の膜に押し込まれた際に、縦方向だけでなく、横方向に押し広げようとする力が働くが、bondedは横に力を緩和することができないため、よりヤング率が高く観察される。

なお、これらの理論は、平坦な表面に対して構築されたものであり、厳密には球形状にはそのまま適応することはできない。一方で、物体の半径が探針曲率半径よりも十分に大きい場合には平坦な表面に近くなるため、ある程度の良い近似を与えてくれると考えられる。物体の半径が探針曲率半径と同程度あるいは小さくなると、この補正はあまり意味をなさないことを留意すべきである。

$$F_{\text{Hertz}}^{\text{brfc}} = \frac{4E^* \alpha_{\text{brfc}}}{3} R^{1/2} \delta^{3/2} \quad \chi = \frac{\sqrt{R\delta}}{h}$$

Dimitriadis model (bonded)

$$\alpha_{\text{brfc}} = 1 + 1.133\chi + 1.283\chi^2 + 0.769\chi^3 + 0.0975\chi^4$$

Dimitriadis model (not-bonded)

$$\alpha_{\text{brfc}} = 1 + 0.884\chi + 0.781\chi^2 + 0.386\chi^3 + 0.0048\chi^4$$

Garcia model

$$\alpha_{\text{brfc}} = 1 + 1.133\chi + 1.497\chi^2 + 1.469\chi^3 + 0.755\chi^4$$

参考文献:

Biophysical Journal 82, 2798 (2002).
Nature Nanotechnology 7, 733 (2012).
Biophysical Journal 114, 2923 (2018).
RSC Advances 10, 19258 (2020)
ACS Nano 15, 20574 (2021).

Bottom Effect Correction for Displacement of Spherical Molecules

Hertz理論は、自由に置かれた2つの物体が自分の重力や外部からの圧力で接触している場合においてのみ厳密に成り立つ。AFM測定においては、観察対象の分子は基板上において吸着しているため、基板によるボトム効果を補正する必要がある。

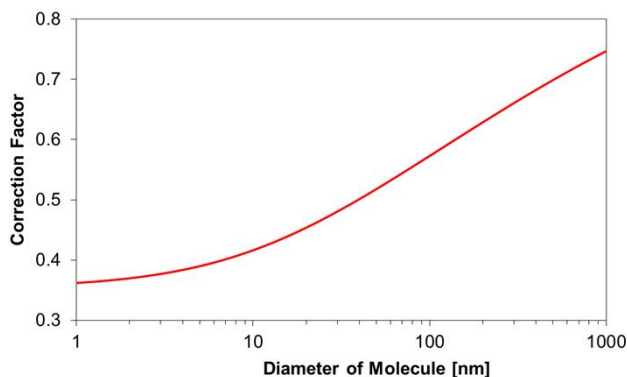
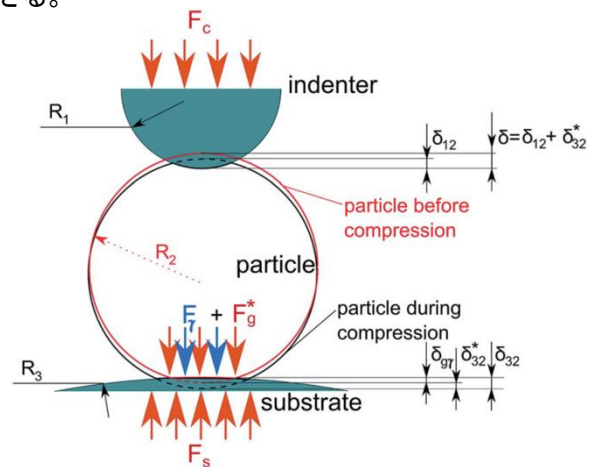
平坦な膜構造の場合には前ページで説明したボトム効果のみを考慮に入れば良い。一方で、球形状の分子の場合には、もう一つ別のボトム効果を考慮に入れる必要がある。

下図に示すように、平坦な表面上に吸着した粒子を探針で押し込むと、上面だけでなく、底面も同時に変形することになる。そのため、例えば、1 nm探針を押し込んだとしても、実際には探針はその半分の0.5 nm程度しか分子にインデントしていないことになる。そのため、前ページのボトム効果とは逆に、見かけ上のヤング率が低く見積もられる。このボトム効果の係数はインデンテーション距離を変数としない探針と分子のサイズのみで決まる係数である。そのため、フィッティングした後で、Excel上でヤング率の補正を行うことができる。

$$F_{\text{Hertz}}^{\text{bdc}} = \frac{4E^* \alpha_{\text{bdc}}}{3} R^{1/2} \delta^{3/2}$$

$$\alpha_{\text{bdc}} = \left[\frac{(R_{\text{tip}} / R_{\text{smp}} + 1)^{1/3}}{(R_{\text{tip}} / R_{\text{smp}} + 1)^{1/3} + (R_{\text{tip}} / R_{\text{smp}})^{1/3}} \right]^{3/2}$$

$$= \frac{1}{\left[\left(\frac{R_{\text{tip}}}{R_{\text{tip}} + R_{\text{smp}}} \right)^{1/3} + 1 \right]^{3/2}}$$



探針曲率半径を5 nmとして、分子の高さ(直径)をパラメータとして計算した補正係数。0.4~0.7程度の値をとることがわかる。

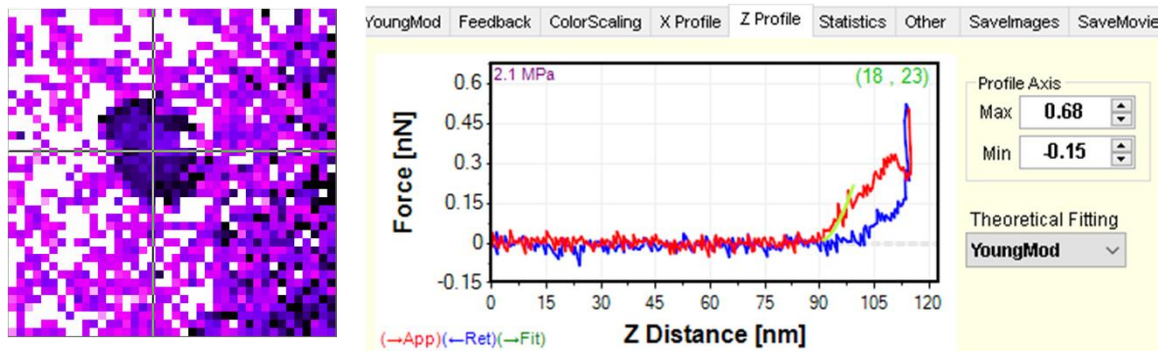
一方で、この理論は観察対象となる粒子が真の球形であることを仮定しているが、実際には基板に吸着したことで、基板側の表面が探針の相互作用がない状態であったとしても、基板相互作用により既にdeformationしており、フラットに近い構造になっていると考えるのが自然である。そのため、この補正係数の影響は小さくなり、1に近くなると考えられる。そのため、20~30%程度しか影響を与えないと考えられる。

参考文献:

Soft Matter, 2014, 10, 6732–6741
 Langmuir 2014, 30, 7206–7212
 Soft Matter, 2017, 13, 1943
 Nanomaterials 2023, 13, 1916

Z Profile

イメージ上の十字線で指定した位置でフォースカーブを取得することができる。ヤング率マップがうまく取得できない場合に、緑色の理論曲線が赤色の Approachカーブに正常にフィットできているか確認するために用いる。2CHがラインが表示された状態で、1CHや3CHなどの別のイメージからデータを取得したい場合には、別のイメージ上をクリックすると、そちらにプロファイル取得を切り替えることができる。

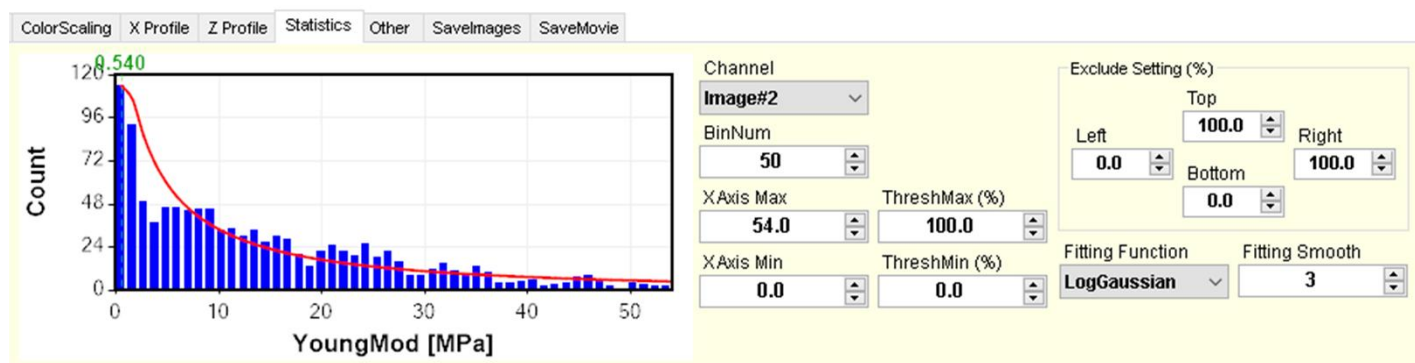


X Profile

X方向のプロファイルを取得する。分子上においてどのようなヤング率分布になっているかチェックするために用いる。



Statistics



ヤング率の統計データを取得する。

基板上に吸着した分子のみの統計データを取得したい場合、基板上的データを排除する必要がある。

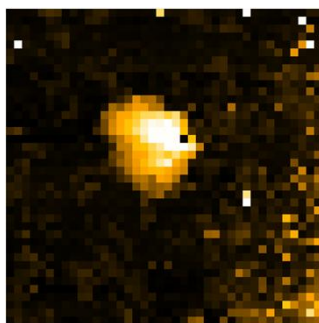
低い位置のデータを除外したい場合、ThreshMin(%)を設定する

高い位置のデータを除外したい場合、ThreshMax(%)を設定する

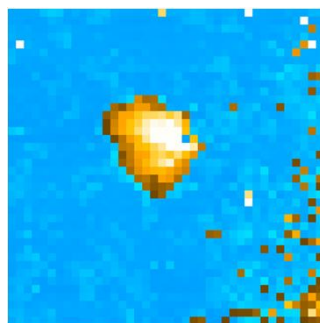
青くマスクされた領域以外の箇所のみから、ヤング率を取得し統計が行われる

ThreshMinだけでは、うまく指定範囲を設定できない場合には、Exclude Settingを使って、手動でマスク領域を設定する(下図の緑の領域がマスク領域)。

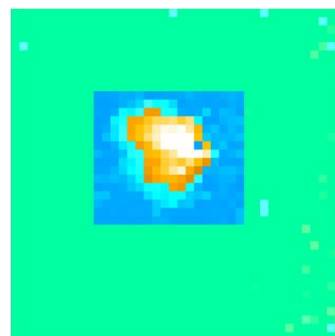
未設定
イメージ



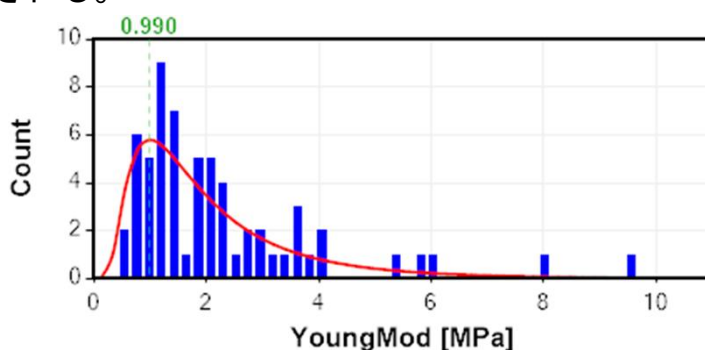
ThreshMin
設定後イメージ



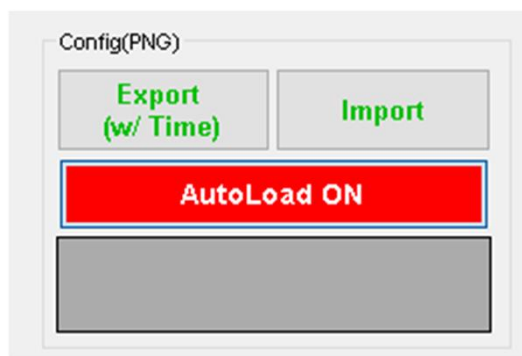
ExcludeSetting
設定後イメージ



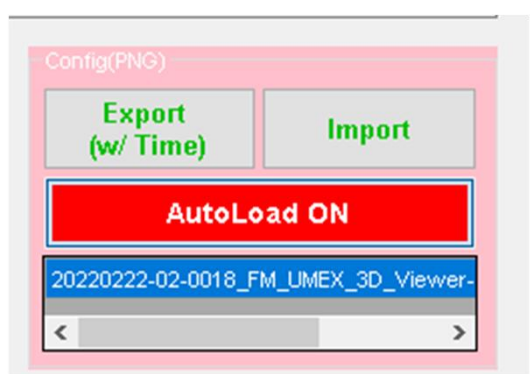
これらの設定を行うと、上図の統計では、うまくピークを検出できていなかったのが、下図のようにピークが表れることが分かる。ピーク値はグラフ上に0.990のように表示される。



Config Export



設定したパラメータはExportボタンで保存することができる。出力したPNGファイルをD&Dで読み込ませ、Importボタンを押すことで再度復元することもできる。



AutoLoad ONを有効にしていると、パラメータファイルが存在するASDファイルを開いた時に、自動でパラメータファイルが読み込まれる。自動で読み込まれた際には、左図のように、Configボックスがピンク色に変化する。