

ピエゾの非線形性の原理

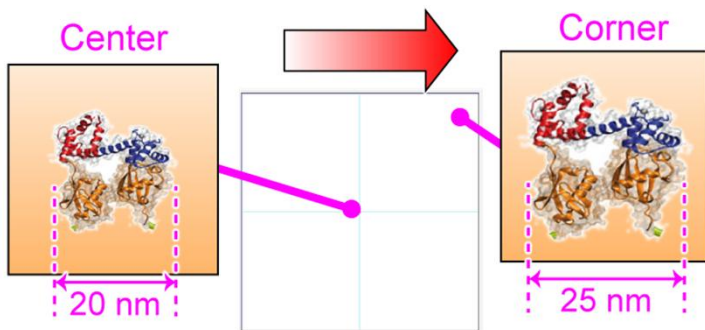
ピエゾの非線形性には以下の4種類がある。
これらのうち、非線形キャリブレーションでは、

1. Tip Position

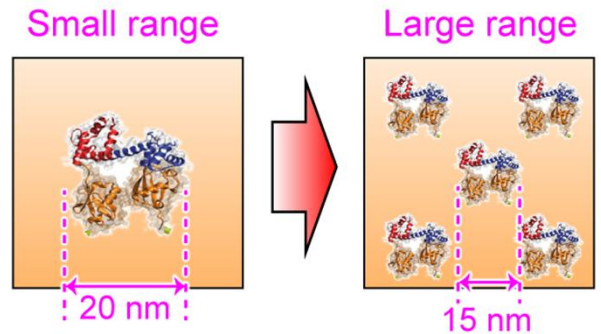
2. Scan Size Nonlinearity

のみの校正を行う。残りの3と4に関しては校正が難しいため、典型的な値を固定値として用いる。

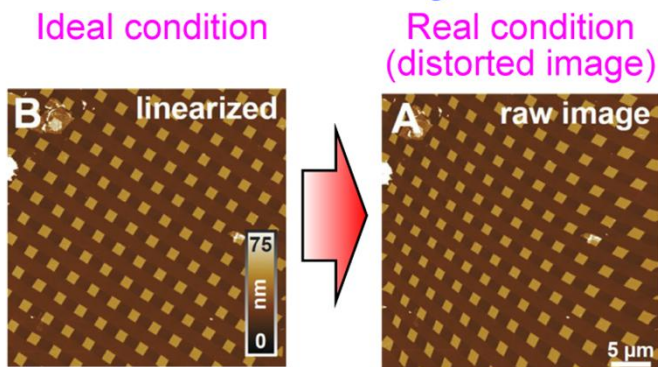
1. Tip Position (Offset Voltage)



2. Scan Size Nonlinearity

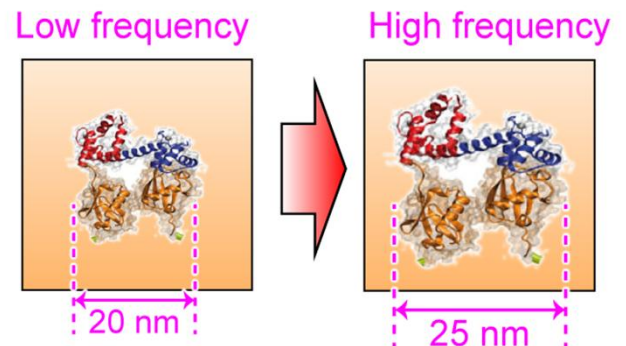


3. Scan Wave Hysteresis



A. Marchesi, K. Umeda(2nd), et al., Sci. Rep., 11, 13003 (2021).

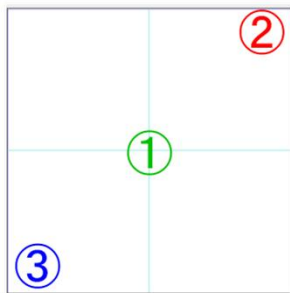
4. Scan Frequency



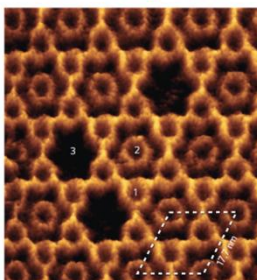
1. Tip Position (Offset Voltage)

通常、ピエゾのキャリブレーションはステージの中央 ($V=50\text{ V}$) で行われる。一方で、目的の試料分子を探すために、オフセット電圧を印加し探針位置を変える必要がある。これにより、圧電定数の実効的な伸び係数が変化するために見かけ上の分子サイズも変化してしまう。次図に示すように、ステージ中央だとアネキシンVの格子長は理想的な 17.7 nm だが、②のように高いオフセット電圧 ($V=100\text{ V}$) を印加すると見かけ上の格子長が25%程度大きくなる。逆に③のように小さなオフセット電圧 ($V=0\text{ V}$) を印加すると見かけ上の格子長が8%程度小さくなる。

Tip Position (Offset Voltage)



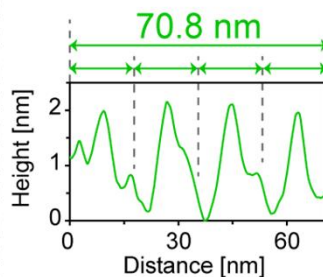
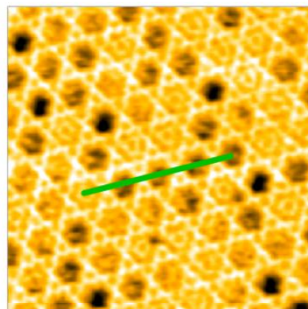
Annexin V
2D-Crystal



17.7 nm

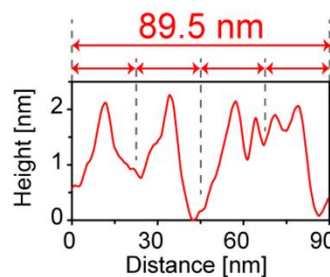
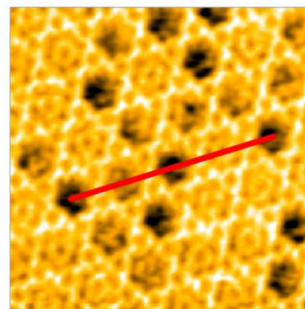
S. Scheuring Lab
Nature Nanotech. 11, 783 (2016).

① Center



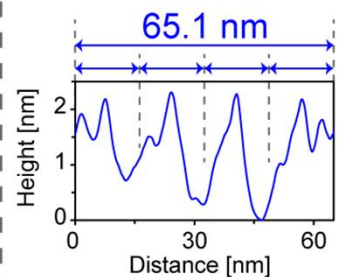
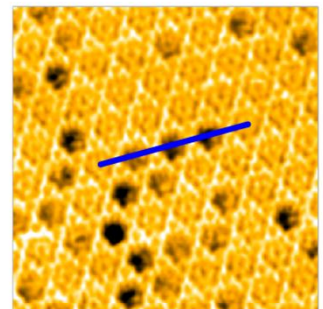
17.7 nm
(Correct)

② High Voltage



22.3 nm
(+25% larger)

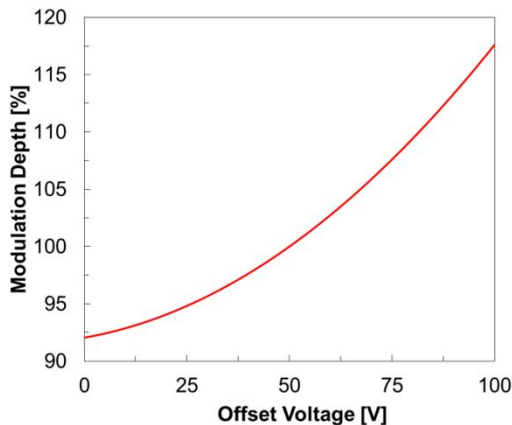
③ Low Voltage



16.3 nm
(-8% smaller)

1. Tip Position (Offset Voltage)

下図のように、スキャンサイズの変調深度をオフセット電圧の二次関数として近似できることが分かった。キャリブレーションでは、オフセット電圧が50 Vのときに圧電定数の校正を行い、 $V=100V$ 付近と $V=0V$ 付近において、それぞれ γ_+ および γ_- 値を校正すれば、非線形パラメータである α や β を得ることができ、全オフセットレンジにおける変調深度を予測することができるようになる。



Second-order Taylor polynomial at $V = 50 \text{ V}$

$$\text{ModulationDepth: } \gamma = 1 + \alpha x + \beta x^2$$

$$x = \frac{V - 50}{100}$$

$$\alpha = \frac{\gamma_+ - \gamma_-}{2}$$

$$\beta = \frac{\gamma_+ + \gamma_-}{2} - 1$$

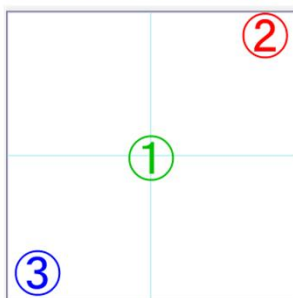
$$\gamma = \gamma_- \text{ (when } V = 0 \text{ V)}$$

$$\gamma = 1 \text{ (when } V = 50 \text{ V)}$$

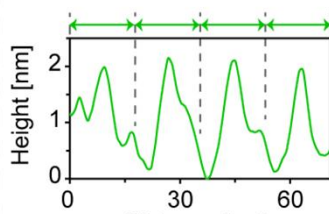
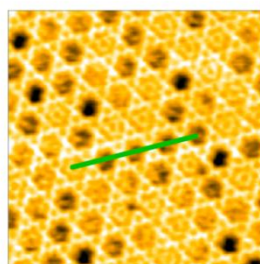
$$\gamma = \gamma_+ \text{ (when } V = 100 \text{ V)}$$

下図に示すように、実際に校正を行ったスキャナーを用いて、オフセット電圧が高い状態や低い状態でスキャンしたところ、中央位置と同様に正しい格子長を得ることができた。

Tip Position
(Offset Voltage)

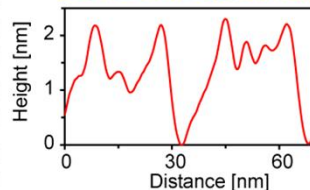
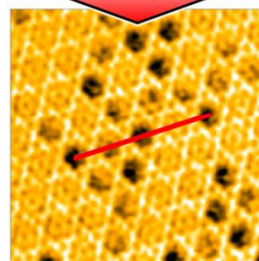
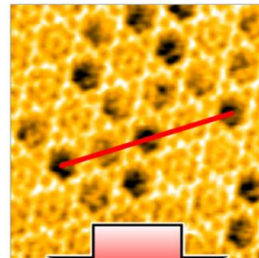


① Center



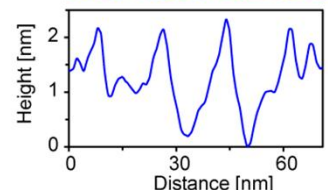
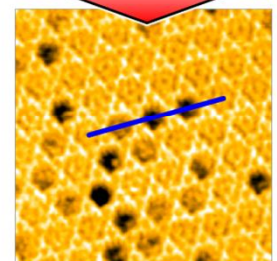
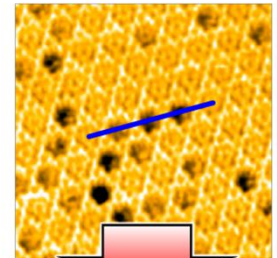
17.7 nm
(Correct)

② High



17.7 nm
(Corrected)

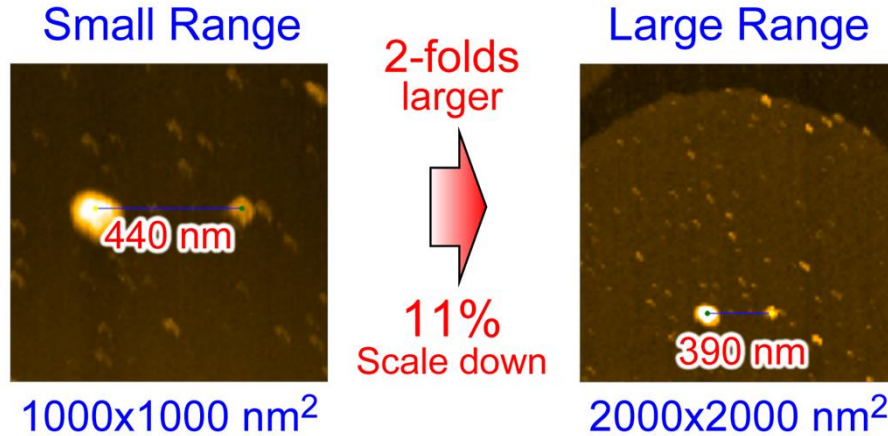
③ Low



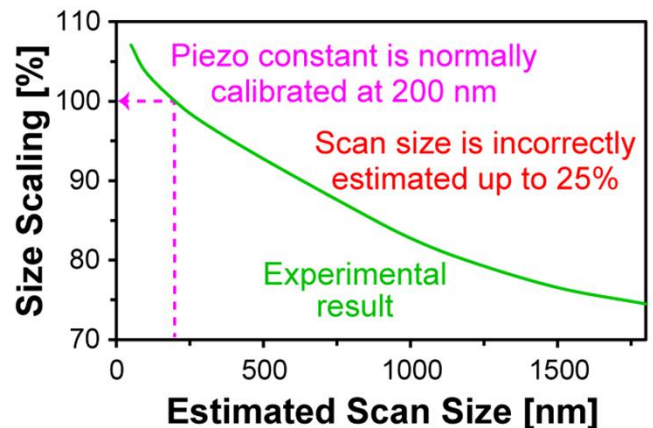
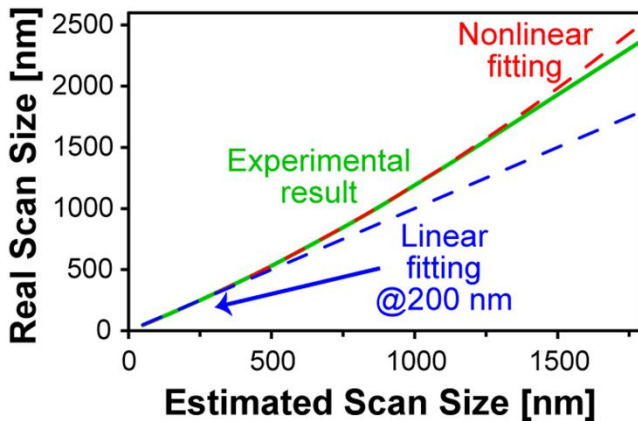
17.7 nm
(Corrected)

2. Scan Size Nonlinearity

ピエゾのスキャンサイズはスキャン電圧の非線形関数である。そのため、次図に示すように、小さなスキャンサイズの時と比べて、大きなスキャンサイズの時の方が見かけ上の分子長が小さくなる。



レーザー変位計を使って調べたところ、左図の緑実線のように、設定したスキャンサイズに対して、実際のスキャンサイズは非線形に増大することが分かった。通常、200 nm スキャンレンジでキャリブレーションが行われるため、圧電定数を線形として計測すると青破線のように大きなスキャンサイズで実際のスキャンレンジとは大きく異なることが分かる。右図のように最大で75%程度まで見かけ上の長さが小さく見積もられることが分かった。そのため、二次式を用いてフィッティングしたところ、左図のように、広範囲において実験結果を再現することができた。



Linear equation

$$x = \alpha_{\text{Linear}} V$$

Second-order Taylor polynomial

$$x = \alpha_{1\text{st}} V (1 + \beta_{2\text{nd}} V)$$

Definition of Variants

Scan Range : x

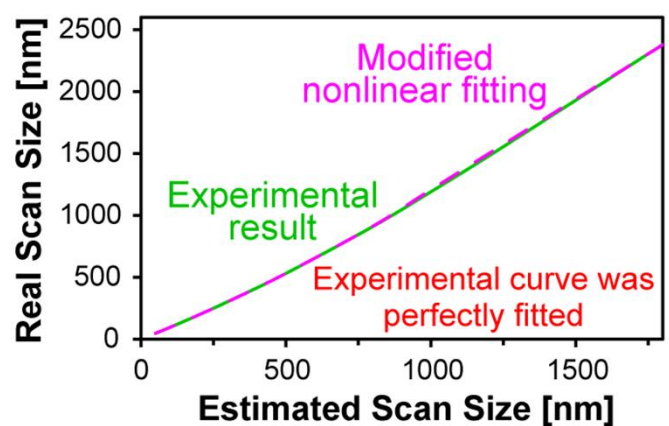
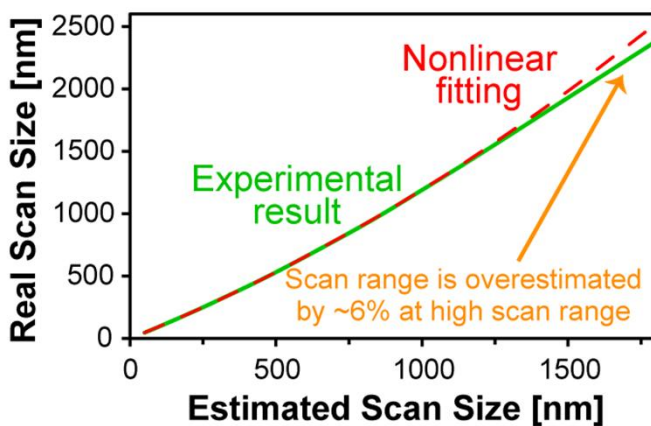
Linearized Piezo Const : α_{Linear}

$$1\text{st-order ScalingFactor} : \alpha_{1\text{st}} = \frac{\alpha_{\text{Linear}}}{1 + \beta_{2\text{nd}} \frac{200}{\alpha_{\text{Linear}}}}$$

2nd-order ScalingFactor : $\beta_{2\text{nd}} \approx 0.5$

2. Scan Size Nonlinearity

しかし、よく見ると、左図に示すように、大きなスキャンサイズにおいてわずかに二次式からズレが見られることが分かった。三次式でフィッティングしようとしたが、三次式の逆関数は得られないことが分かった。プログラムの動作上、陽関数の形での逆関数が必要となる。そのため、50%以下のスキャンレンジでは二次関数を用い、それ以上のスキャンレンジでは外挿した線形式を用いることにした。その結果、右図に示すように実験結果を全てのスキャン範囲においてカバーできるようになった。



Problem of 3rd-order polynomial

$$x = \alpha_{1st} V (1 + \beta_{2nd} V + \gamma_{3rd} V^2)$$

Inverse function of cubic equation cannot be analytically derived

Low Scan Range ($V < W$)

$$x = \alpha_{1st} V (1 + \beta_{2nd} V)$$

$$V = \frac{\sqrt{1 + \frac{4\beta_{2nd}x}{\alpha_{1st}}} - 1}{2\beta_{2nd}}$$

High Scan Range ($V \geq W$)

$$x = \alpha_{1st} [(1 + 2\beta_{2nd}W)V - \beta_{2nd}W^2]$$

$$V = \frac{x + \alpha_{1st}\beta_{2nd}W^2}{\alpha_{1st}(1 + 2\beta_{2nd}W)}$$

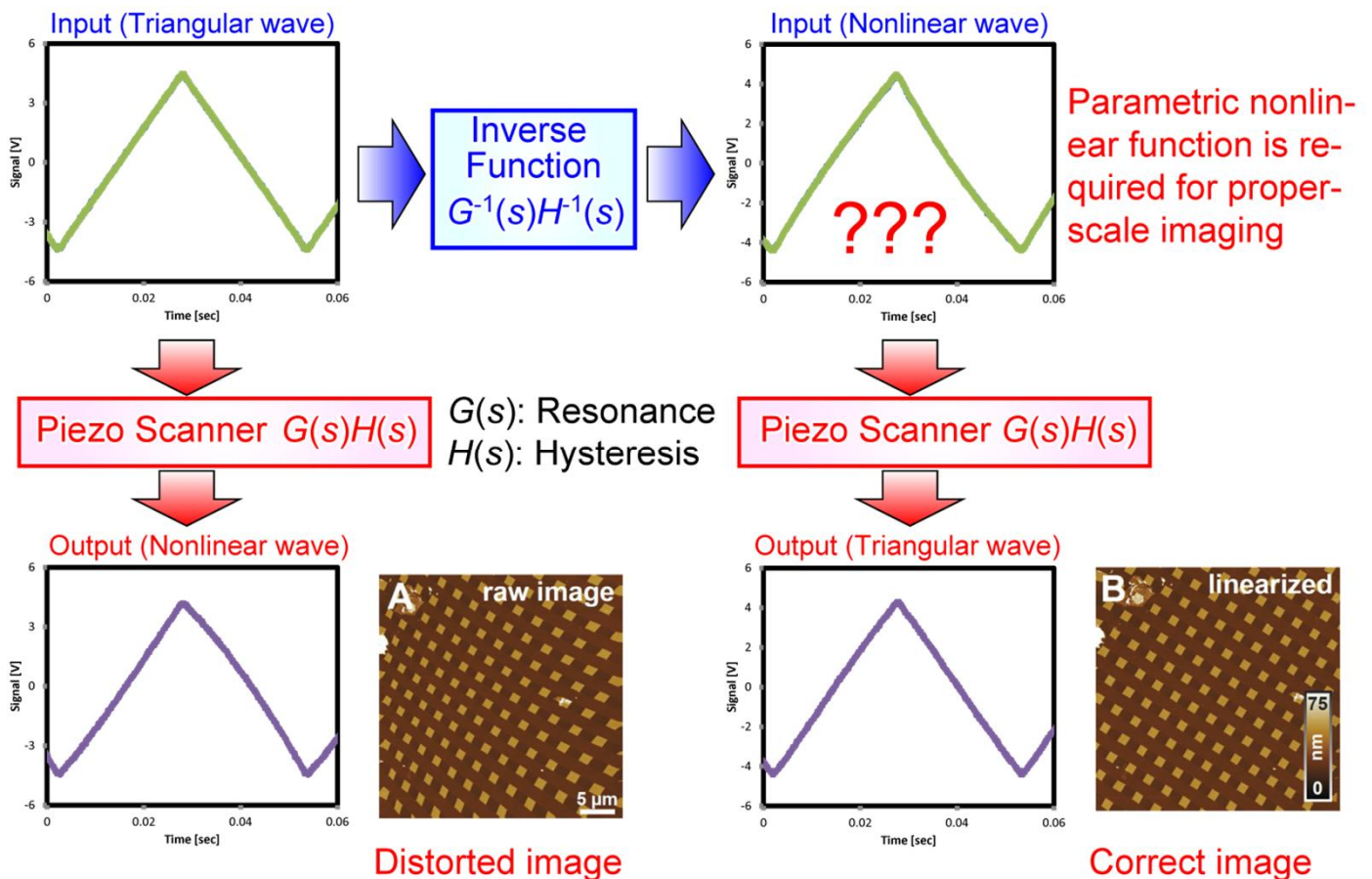
2nd-order polynomial is linearly extrapolated to high scan range

3. Scan Wave Hysteresis

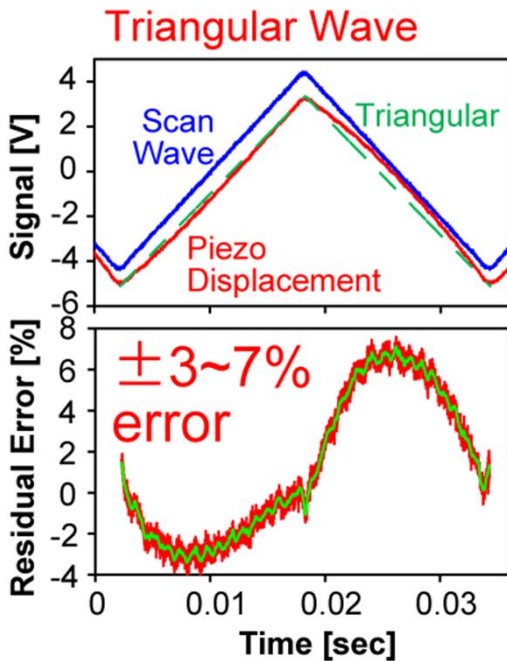
下図に示すように、 piezo素子を駆動するために三角波が用いられる。しかしpiezo素子の共振特性とヒステリシス特性の伝達関数が乗算されたものが実際のpiezoの変位となるため、左下図のように波形が歪んでしまう。そのため、得られるAFM像も歪んだものとなる。

そのため、右上図のようにこれらの特性の逆伝達関数を用いて、逆方向に歪ませた波形をpiezo素子に入力することで右下図にあるようにまっすぐな三角波を生成することができる。

piezoの共振特性に関しては、レーザー変位計を用いて測定したスペクトルを用いてフィードフォワード駆動することで補正することができる。一方で、ヒステリシス補正に関してはPreisach（プライザッハ）modelなどの解析モデルが提唱されているが、キャリブレーションが難しいため、より簡便な方法が必要となる。piezo素子には二種類あり、ソフトpiezoとハードpiezoがある。高速AFMで用いられるのはハードpiezoであり、ソフトpiezoと比べてヒステリシス特性は非常に小さく簡単な解析式で再現できる。



3. Scan Wave Hysteresis



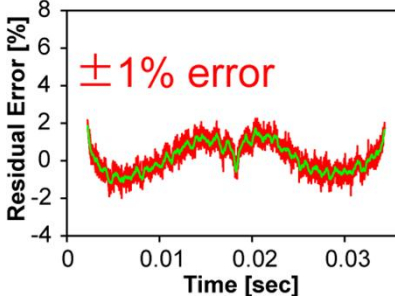
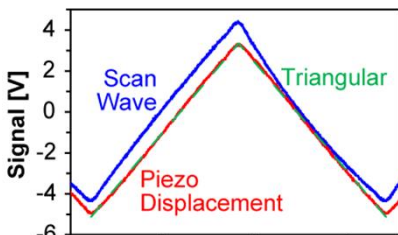
左図に示すように、三角波の方法だと偏差が3~7%生じてしまう。偏差を見て分かる通り、波形は非対称となっており、Forwardスキャンと比べてBackwardスキャンの方が非線形性が大きくなる。

そのため、非線形解の導出を行った。非線形解を作るに当たって、共振特性の逆伝達特性を乗算するためにフーリエ級数展開できることが必須条件となる。そのため、下図に示すように、指数関数を用いて、非線形波を関数を導出した。この式は右に示すようにフーリエ級数を得ることができる。これにより、偏差を1%まで減らすことができた。

更に偏差を小さくするために、次ページに示すように波形の非対称性を考慮に入れた、Sin波を乗算した式も導出した。

Scan Waveform1

$$f(x) = \begin{cases} \frac{1 - \exp\left(-\frac{\beta_1}{\alpha}x\right)}{1 - \exp(-\beta_1)} & \dots \quad 0 < x \leq \alpha \\ 1 - \frac{\exp\left[-\beta_2\left(\frac{x-\alpha}{1-\alpha}\right)\right]}{1 - \exp(-\beta_2)} & \dots \quad \alpha < x \leq 1 \end{cases}$$



Fourier Series Expansion

$$f(x) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} [a_n \cos(n\omega t) + b_n \sin(n\omega t)]$$

$$a_0 = \alpha \left(\frac{1}{\exp \beta_1 - 1} - \frac{1}{\beta_1} + 1 \right) + (\alpha - 1) \left(\frac{1}{\exp \beta_2 - 1} - \frac{1}{\beta_2} \right)$$

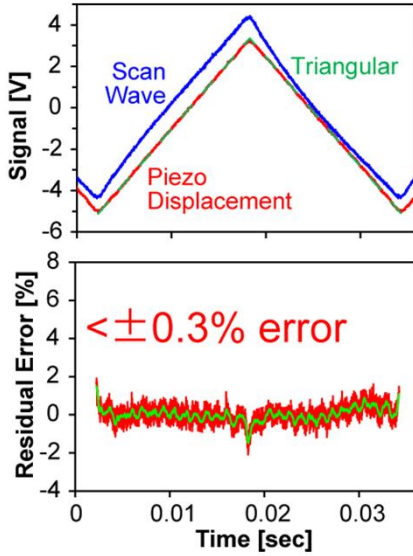
$$a_n = \frac{1}{2(\exp \beta_1 - 1)} \left\{ \frac{\exp \beta_1 \sin(2\pi\alpha n)}{\pi n} - \frac{2\alpha [-\beta_1 \cos(2\pi\alpha n) + 2\pi\alpha n \sin(2\pi\alpha n) + \beta_1 \exp \beta_1]}{(2\pi\alpha n)^2 + \beta_1^2} \right\} \\ + \frac{\exp(-\beta_2)}{1 - \exp(-\beta_2)} \left\{ \frac{\sin(2\pi n) - \sin(2\pi\alpha n)}{2\pi n} + \frac{(\alpha - 1)}{[2\pi(\alpha - 1)n]^2 + \beta_2^2} \left\{ \beta_2 [\cos(2\pi n) - \exp \beta_2 \cos(2\pi\alpha n)] \right. \right. \\ \left. \left. + 2\pi(\alpha - 1)n [\sin(2\pi n) - \exp \beta_2 \sin(2\pi\alpha n)] \right\} \right\}$$

$$b_n = \frac{1}{\exp \beta_1 - 1} \left\{ \frac{\exp \beta_1 \sin^2(\pi\alpha n)}{\pi n} + \frac{\alpha [2\pi\alpha n [\cos(2\pi\alpha n) - \exp \beta_1] + \beta_1 \sin(2\pi\alpha n)]}{(2\pi\alpha n)^2 + \beta_1^2} \right\} \\ + \frac{\exp(-\beta_2)}{1 - \exp(-\beta_2)} \left\{ \frac{\cos(2\pi\alpha n) - \cos(2\pi n)}{2\pi n} + \frac{(\alpha - 1)}{[2\pi(\alpha - 1)n]^2 + \beta_2^2} \left\{ \beta_2 [\sin(2\pi n) - \exp \beta_2 \sin(2\pi\alpha n)] \right. \right. \\ \left. \left. - 2\pi(\alpha - 1)n [\cos(2\pi n) - \exp \beta_2 \cos(2\pi\alpha n)] \right\} \right\}$$

3. Scan Wave Hysteresis

Scan Waveform2

$$f(x) = \begin{cases} (1+2\gamma_1) \left[\frac{1 - \exp\left(-\beta_1 \frac{x}{\alpha}\right)}{1 - \exp(-\beta_1)} \right] + \gamma_1 \left[\cos\left(\pi \frac{x}{\alpha}\right) - 1 \right] & \dots 0 < x \leq \alpha \\ (1+2\gamma_2) \left[\frac{1 - \exp\left[-\beta_2 \left(\frac{x-\alpha}{1-\alpha}\right)\right]}{1 - \exp(-\beta_2)} \right] - \gamma_2 \left[\cos\left(\pi \frac{x-\alpha}{1-\alpha}\right) + 1 \right] & \dots \alpha < x \leq 1 \end{cases}$$



Fourier Series Expansion

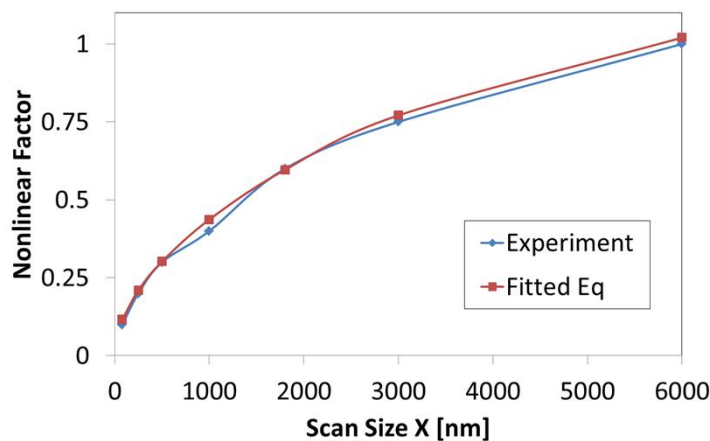
$$f(x) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \left[a_n \cos(n\omega t) + b_n \sin(n\omega t) \right]$$

$$a_0 = (1+2\gamma_1) \left[\alpha \left(\frac{1}{\exp \beta_1 - 1} - \frac{1}{\beta_1} + 1 \right) + (\alpha-1) \left(\frac{1}{\exp \beta_2 - 1} - \frac{1}{\beta_2} \right) \right] - \alpha \gamma_1 + (\alpha-1) \gamma_2$$

$$a_n = (1+2\gamma_1) \left\{ \frac{1}{2(\exp \beta_1 - 1)} \left\{ \frac{\exp \beta_1 \sin(2\pi \alpha n)}{\pi n} - \frac{2\alpha \left[-\beta_1 \cos(2\pi \alpha n) + 2\pi \alpha n \sin(2\pi \alpha n) + \beta_1 \exp \beta_1 \right]}{(2\pi \alpha n)^2 + \beta_1^2} \right\} \right. \\ \left. + \frac{\exp(-\beta_2)}{1 - \exp(-\beta_2)} \left\{ \frac{-\sin(2\pi n) - \sin(2\pi \alpha n)}{2\pi n} + \frac{(\alpha-1)}{[2\pi(\alpha-1)n]^2 + \beta_2^2} \left\{ \beta_2 \left[\cos(2\pi n) - \exp \beta_2 \cos(2\pi \alpha n) \right] \right. \right. \right. \right. \\ \left. \left. \left. + 2\pi(\alpha-1)n \left[\sin(2\pi n) - \exp \beta_2 \sin(2\pi \alpha n) \right] \right\} \right\} \right\} \\ - \frac{\gamma_1 \left[2(2\alpha n)^2 - 1 \right] \sin(2\pi \alpha n)}{2\pi n \left[(2\alpha n)^2 - 1 \right]} + \gamma_2 \frac{\left[8(\alpha-1)^2 n^2 - 1 \right] \sin(2\pi \alpha n)}{2\pi n \left[4(\alpha-1)^2 n^2 - 1 \right]}$$

$$b_n = (1+2\gamma_1) \left\{ \frac{1}{\exp \beta_1 - 1} \left\{ \frac{\exp \beta_1 \sin^2(\pi \alpha n)}{\pi n} + \frac{\alpha \left[2\pi \alpha n \left[\cos(2\pi \alpha n) - \exp \beta_1 \right] + \beta_1 \sin(2\pi \alpha n) \right]}{(2\pi \alpha n)^2 + \beta_1^2} \right\} \right. \\ \left. + \frac{\exp(-\beta_2)}{1 - \exp(-\beta_2)} \left\{ \frac{-\cos(2\pi \alpha n) - \cos(2\pi n)}{2\pi n} + \frac{(\alpha-1)}{[2\pi(\alpha-1)n]^2 + \beta_2^2} \left\{ \beta_2 \left[\sin(2\pi n) - \exp \beta_2 \sin(2\pi \alpha n) \right] \right. \right. \right. \right. \\ \left. \left. \left. - 2\pi(\alpha-1)n \left[\cos(2\pi n) - \exp \beta_2 \cos(2\pi \alpha n) \right] \right\} \right\} \right\} \\ + \gamma_1 \frac{\left[2(2\alpha n)^2 - 1 \right] \cos(2\pi \alpha n) + 1}{2\pi n \left[(2\alpha n)^2 - 1 \right]} - \gamma_2 \frac{\left[8(\alpha-1)^2 n^2 - 1 \right] \cos(2\pi \alpha n) + 1}{2\pi n \left[4(\alpha-1)^2 n^2 - 1 \right]}$$

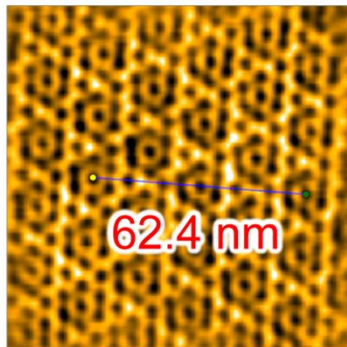
非線形波のパラメータはスキャンサイズとオフセット電圧の関数となる。この非線形パラメータをパラメトライズしたところ、次式でフィッティングできることが分かった。ヒステリシスの正確な校正は難しいため、典型的なパラメータを固定値として使用する。



$$\beta_x = \underbrace{\gamma \left(\frac{\text{ScanSize}}{\text{MaxSize}} \right)^{0.5-0.25 \frac{\text{ScanSize}}{\text{MaxSize}}}}_{\text{Scan Size Dependency}} \times \underbrace{\left\{ 1 + \varepsilon \left[\left(0.5 - \frac{\text{Offset}}{\text{MaxSize}} \right)^\kappa - 0.5^\kappa \right] \right\}}_{\text{Offset Dependency}}$$

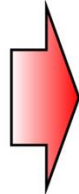
4. Scan Frequency

High Frequency



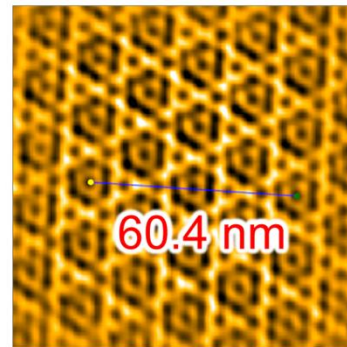
7.3 FPS
(150 $\mu\text{m/s}$, 770 Hz)

14-folds
slower



3.3%
Scale down

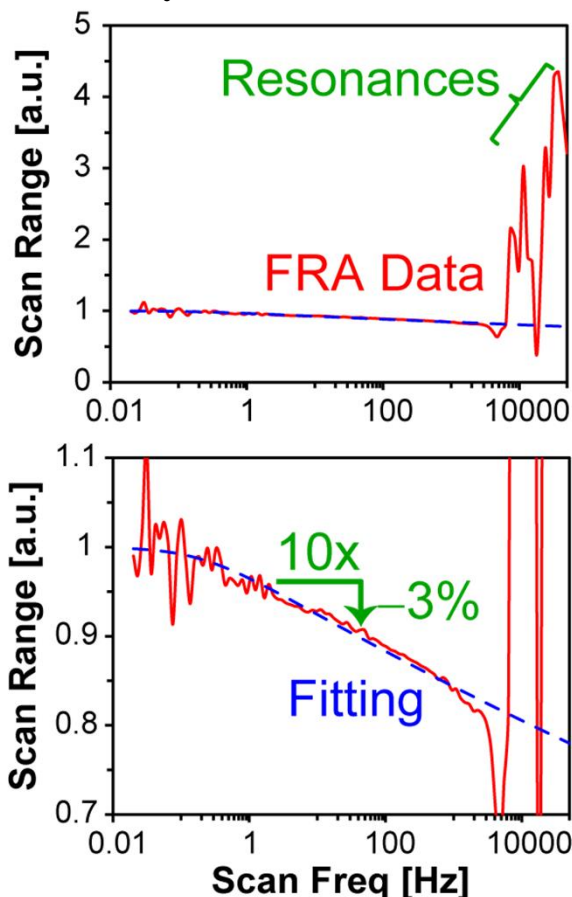
Low Frequency



0.5 FPS
(10 $\mu\text{m/s}$, 50 Hz)

ピエゾの変位は強誘電体の分極によって発生するが、これが高周波領域では応答しなくなってくるため、周波数とともに圧電定数は小さくなる。そのため、高周波スキャンと比べて低周波スキャンの方がスキャン範囲が大きくなり、見かけ上の分子サイズも小さくなる。

この効果を調べるために、レーザー変位計を使って測定したピエゾ素子の周波数特性を下図に示す。周波数とともにスキャンサイズが減少し、高周波領域では共振ピークが現れていることが分かる。右に示す数式を用いてフィッティングしたところ、うまくフィットできた。この式からカットオフ周波数は0.2 Hzでゲインの勾配は0.03であることが分かった。どのピエゾ素子も大きくパラメータに違いが見られないため、これを共通パラメータとして用いている。



Derived frequency characteristics

$$\text{ScanRange} = \frac{1}{\left(1 + \frac{\text{ScanFreq}}{\text{CutoffFreq}}\right)^{\frac{\alpha}{2}}}$$

$$\approx 1 - \alpha \log_{10} \left(2 \frac{\text{ScanFreq}}{\text{CutoffFreq}} \right)$$

$$\text{CutoffFreq} = 0.2 \text{ Hz}$$

$$\alpha = 0.03$$

With increasing scan frequency
10-folds, Scan range decreases
by ~3%

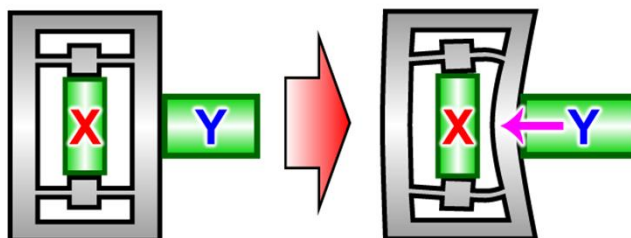
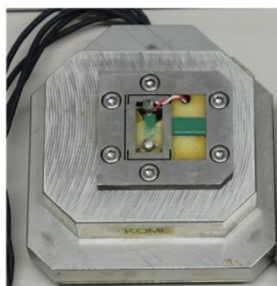
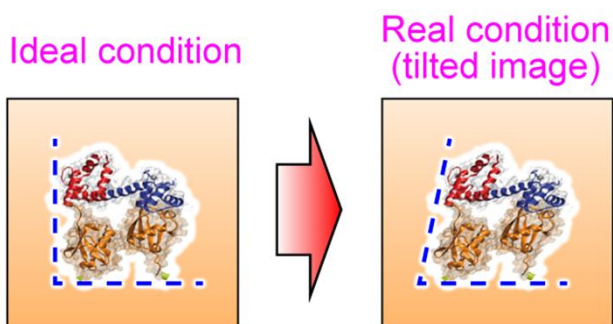
5. Other Factors

上記で述べた効果以外にも下図に示すように、XピエゾとYピエゾのクロストークにともなう効果も影響する。Yピエゾが伸びるとXピエゾの保持機構が歪むために、X方向に歪んでしまい、観察される分子イメージにシアーがかかってしまう問題がある。

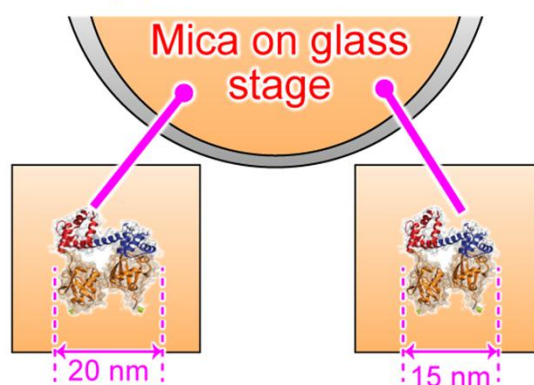
更に、アプローチ場所によってもわずかに圧電定数が異なる問題もある。

これらの問題はジュラルミン製のスキャナーを用いた場合に、顕著に表れるが（3%程度）、SUS製のスキャナーを用いた場合には、剛性が高いために小さく抑えることができるため（1%程度）、あまり気にしなくとも良い。

5. XY-Piezo Crosstalk



6. Approach Position



アネキシンを用いたスキヤナーの 非線形キャリブレーション

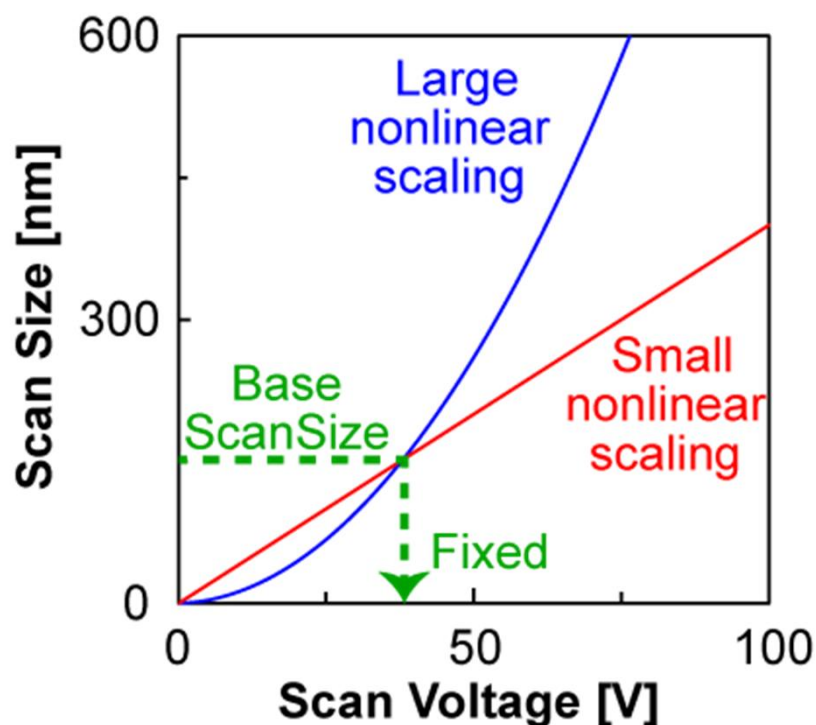
スキャンサイズの選定方法

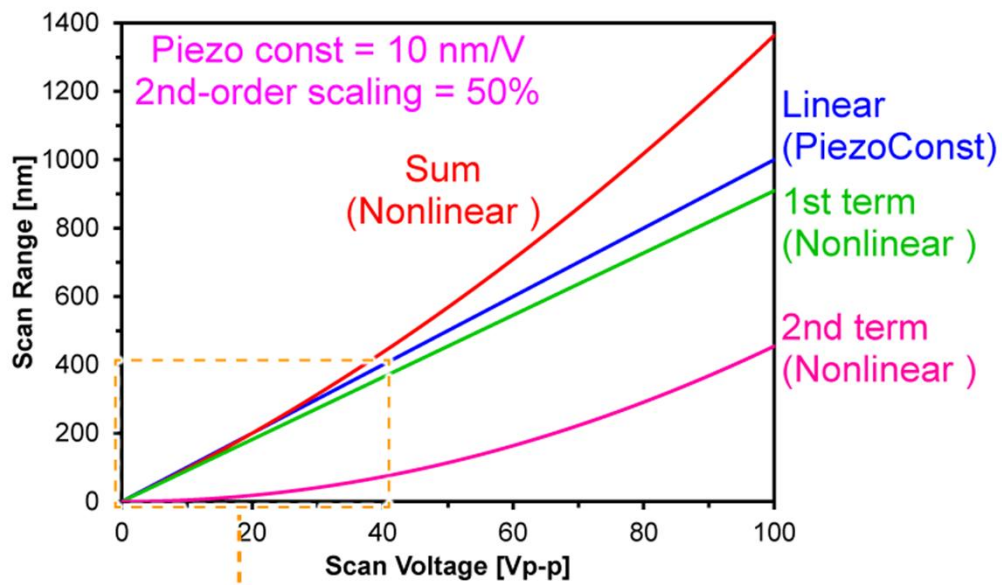
キャリブレーションで用いたScanSizeにおいて、もっともScanSizeが正確に求まるため、実際のAFM観察でもっともよく用いるScanSizeを用いてキャリブレーションを行う。キャリブレーションでは二種類のScanSizeを選ぶことができる。

一般的な生体分子計測の場合には、500 nm以下のスキャンサイズの実験が行われるため、このマニュアルでは、200 nmと500 nmでキャリブレーションするものとして説明する。まず、200 nmをBaseScanSizeに入力した状態で200 nmのScanSizeでキャリブレーションを行い、ScanSizeを500 nmに変更した後に、Parameter3_Nonlinear Scaling for Scan Size(%)のキャリブレーションを行う。

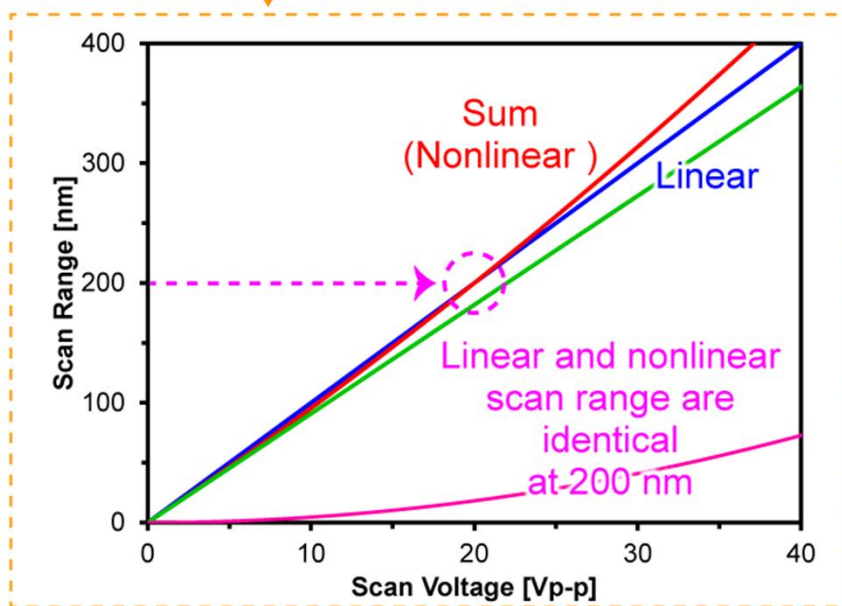
Annexin-Vを用いた場合には、200～500 nm以外のスキャン範囲だと格子が見えづらくなるため、これ以外のスキャンサイズでキャリブレーションすることは難しい。もし、他のスキャンサイズを用いたい場合には、そのサイズに適したキャリブレーション試料を用いる必要がある。

Ultra-Largeスキヤナーの場合には、35 μm 程度の大きなスキャンサイズが一般的に用いられるため、ミクロンサイズのカリブレーショングレイティングを用いてキャリブレーションを行うと良い。この場合には、まず、35,000 nmでキャリブレーションを行う。もし、これ以外のスキャンサイズを用いないのであれば、Parameter3_Nonlinear Scaling for Scan Size(%)はキャリブレーションする必要がない。それ以外のスケールでも用いる場合には、そのサイズに設定した後に、Parameter3_Nonlinear Scaling for Scan Size(%)のキャリブレーションを行う。



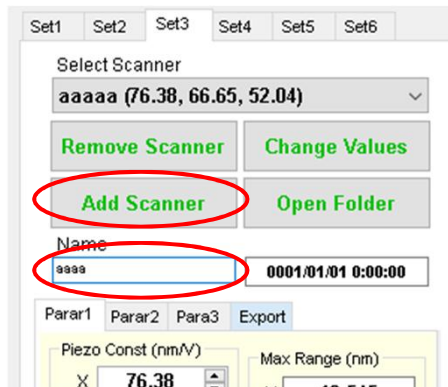


Magnified

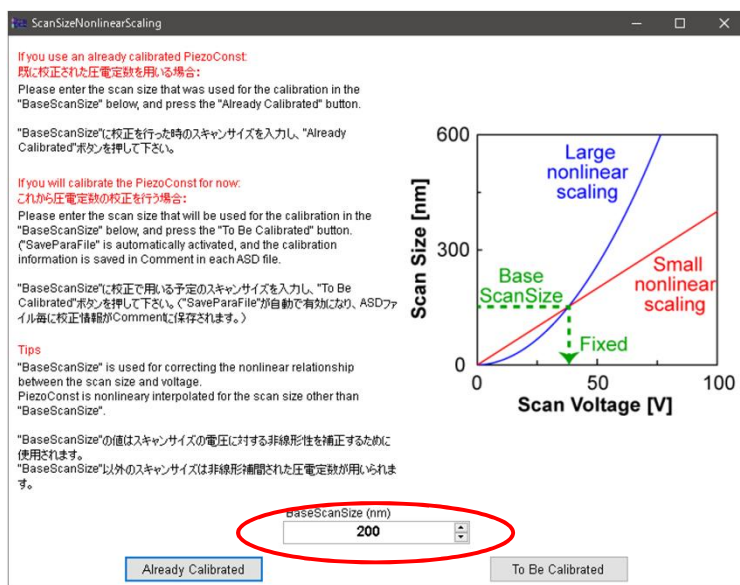


キャリブレーション前に行う設定

新たにスキャナーを登録する場合



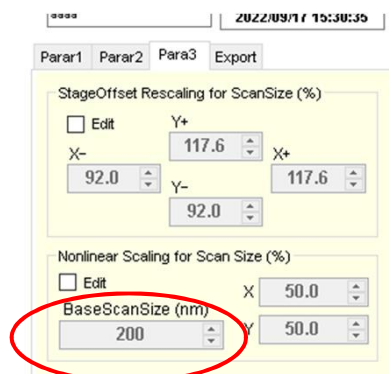
Nameにスキャナー名を入力後に、Add Scannerボタンを押すと、スキャナーが登録されるとともに、以下のダイアログが表示される。



以下の画像のようにダイアログの下部に、BaseScanSize (nm)という数値ボックスが表示されるため、ここにキャリブレーションで用いるスキャンサイズを入力する。測定でもっとも用いるスキャンサイズを用いる。典型的には200x200 nmサイズでキャリブレーションを行う。

Nonlinear Scaling for Scan Size(%)を変更するとスキャンサイズの電圧に対する非線形性が変化する。このとき、BaseScanSize (nm)で設定したスキャンサイズでは、非線形性を変化させても出力電圧値は変化しない。そのため、BaseScanSize (nm)で圧電定数を校正してから、Nonlinear Scaling for Scan Size(%)を校正することで、全スキャンサイズにおいて正確なスキャンが可能となる。

既に登録してあるスキャナーの校正をし直す場合



圧電定数を校正する前に、BaseScanSize (nm)にキャリブレーションで使用するスキャンサイズが入力されていることを確認する。もし、違った値が入力されている場合には、Editボックスにチェックを入れて、BaseScanSize (nm)を有効にし、キャリブレーションで用いるスキャンサイズを入力する。

キャリブレーション前に行う設定

観察前に確認すべきこと



XYのピエゾアンプのオフセット電圧が50 Vに設定されていることを確認する。
このオフセット電圧が変わると、キャリブレーション値も変化してしまうため、
キャリブレーション以外の測定中にも50 V以外の設定にしないようにする。

非線形キャリブレーションを行わない場合

定量的な距離計測が必要でない場合には、非線形キャリブレーションを行う必要はない。
その場合、BaseScanSizeにキャリブレーションを行ったスキャンサイズを入力し、
Parameter3 StageOffset Rescaling for ScanSize とParameter3_Nonlinear Scaling for Scan Size(%)の
チェックボックスをブランクしておく。すると、典型的な非線形パラメータが使用される。
スキャナーごとに20%程度しか誤差がないため、非線形キャリブレーション無しでもある
程度は定量的な測定が可能である。

キャリブレーション試料の調製方法

アネキシンの結晶構造が一辺17.7nmの正三角形であることを利用しスキャナーの校正をする。

大まかな流れ

- ①中心で校正 (Parameter1_Piezo Const(nm/V)を決定)
- ②左右上下で校正 (Parameter3_StageOffset Rescaling for Scan Size(%)を決定)
- ③Scan Size を変更して校正 (Parameter3_Nonlinear Scaling for Scan Size(%)を決定)

試料準備

- ・ Buffer 150mM NaCl, 2mM CaCl₂, 10mM HEPES-NaOH.pH7.4
- ・ 脂質 DOPC:DOPS:biotin-capDOPE=70:20:10
1mg/ml in 150mM NaCl, 2mM CaCl₂, 10mM HEPES-NaOH.pH7.0

※全ての待ち時間は乾燥防止のためふたをする。

- ・ 脂質は-20℃保存で1か月くらい使用可能。
- ・ アネキシンは、1チューブ分を解凍した後は再凍結せず、on ice もしくは4℃保存で再使用可能。

①

- ▼脂質を超音波5分かける。
- ▼2μl マイカ上にのせ3分待つ。 ※直前にマイカを劈開し、できるだけ早くのせる。
- ▼MQW2μl 追加し3分待つ。(膜がはりやすくなる)
- ▼MQW2μl入れてピペッティングし2μl抜き1～2分待つ。
- ▼MQW20μl×5回リンスする。
- ▼Buffer20μl×1回リンスする。
- ▼1μM アネキシンを1μl入れてピペッティングし5分待つ。
※まず20μlピペットでよく混ぜてから取るとよい。
- ▼ Buffer20μl×1回リンスする。(10μlでもよい。この工程で穴が増える)

②

- ▼脂質を超音波3分かける。(1日の実験のはじめだけ)
- ▼1μl マイカ上にのせ3分待つ。 ※直前にマイカを劈開し、できるだけ早くのせる。
- ▼MQW3μl 追加しピペッティングし3分待つ。(膜がはりやすくなる)
- ▼ろ紙で少し吸い取りMQW20μlのうち、数μl (のせられるだけ) のせ30秒待つ。
- ▼残りのMQWでリンスする。
- ▼Buffer20μl×2回リンスする。(ミスで乾くのを防ぐためリンス回数少なめにしている)
- ▼1μM アネキシンを1μl入れてピペッティングし5分待つ。
※まず20μlピペットでよく混ぜてから取るとよい。
- ▼ Buffer20μl×1回リンスする。(10μlでもよい。この工程で穴が増える)

③

- ▼脂質を超音波3分かける。(1日の実験のはじめだけ)
- ▼1μl マイカ上にのせ3分待つ。 ※直前にマイカを劈開し、できるだけ早くのせる。
- ▼MQW3μl 追加しピペッティングし3分待つ。(膜がはりやすくなる)
- ▼MQW20μlのうち、数μl (のせられるだけ) のせ30秒待つ。
- ▼残りのMQWでリンスする。
- ▼Buffer20μl×2回リンスする。
- ▼1μM アネキシンを1μl入れてピペッティングし5分待つ。
※まず20μlピペットでよく混ぜてから取るとよい。
※ Bufferリンスはしない。

※②と③では、ミスで乾くのを防ぐためリンス回数を少なめにしている。

キャリブレーションの観察条件

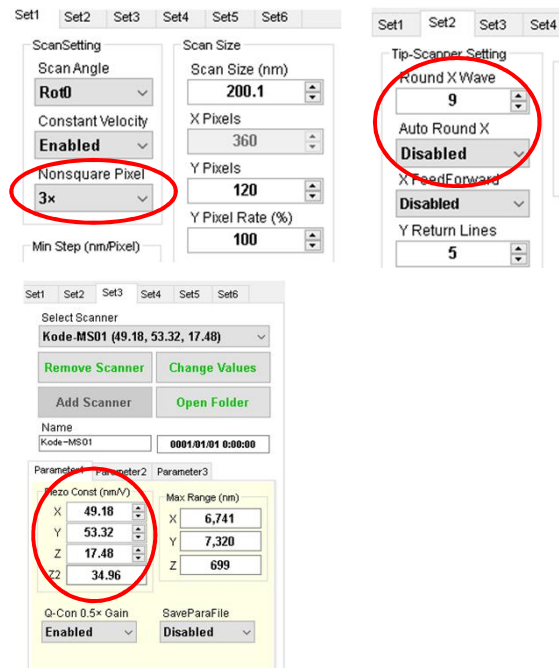
観察設定

UMEX Sample-Scan

- imaging > Set1 Nonsquare Pixel → 3 ×
- Scan Size 200x200 nm²
Pixel 360x120
FrameTime 0.33sec
- Imaging > Set2 Round X Wave → 9
Auto Round X → Disabled
- imaging > Set3 Select Scannerでスキャナー名と現在のPiezo Constを設定する。

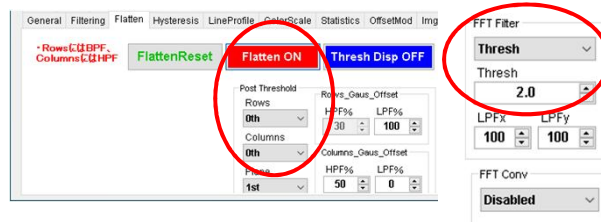
観察中の注意

何度もScan⇔計測を繰り返すので、針を保護するため、イメージングしていないときは、referenceを上げてから、少しモーターでもReleaseしておく。



UMEX Viewer

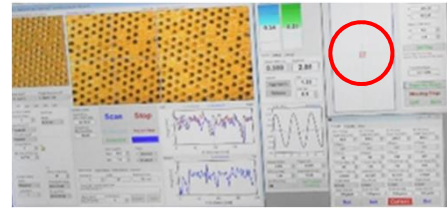
- Flatten ON
- Post Threshold Rows 0th Columns 0th
- FFT Filter Thresh 1~2 (4以下で見やすいところを選ぶ)



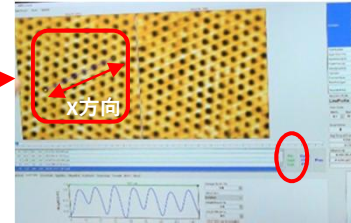
手順詳細

① Parameter1 Piezo Constを決定（中心で測定）

- 1 中心でドリフトがおさまるまでScan。
- 2 UMEX Viewerに読み込み、LineProfileで穴の中心から中心まで線を引き計測。X方向から計測する。
- 3 Excelのキャリブレーションファイルに入力。
- 4 補正後の電圧定数をParameter1 Piezo Constに入力。
- 5 OK判定（ $\pm 0.8\%$ ）ができるまで1～4を繰り返す。
（Excel Fileは適宜copy&pasteして使用する）



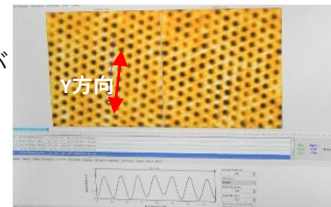
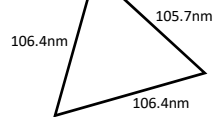
1chの画像の中心部で計測する



| 現在のPiezo Const | 計測した長さ | 格子の数 | 理論上の長さ | 補正後のPiezo Const | 判定 |
|--------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------|----------------|
| Current PiezoConst(nm/V) | LineProfile Distance(nm) | Lattice Number | Theoretical Distance(nm) | Corrected PiezoConst(nm/V) | Residual Error |
| 実験前の値 → 16.51 | 126.3 | 7 | 123.9 | 16.19627078 | NG 1.937% |
| 16.3 | 124.9 | 7 | 123.9 | 16.1684956 | NG 0.807% |
| 16.24 ← | 106.4 | 6 | 106.2 | 16.20947368 | OK 0.188% |

この結果付近の値を次のPiezo Constとして入力。

- 6 Y方向も同様にPiezo Constを決定する。
- 7 残り1辺を確認。（多少のゆがみがあるので三角形のバランスを控えておく。）
- 8 change Values で変更を保存。



変更後 change Values。

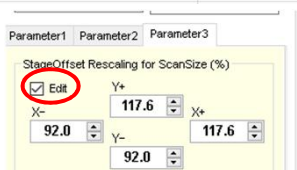
② Parameter3 StageOffset Rescaling for ScanSizeを決定（左右上下で測定）

- 1 右端へ移動し、ドリフトがおさまるまでScan。
※移動するとStopボタンにXYのゆがみが%表示される。
一度Stopし再度Scanすることで100%でScanできる。
- 2 UMEX ViewerでRe-load、LineProfileで計測。X方向から。
- 3 Excelのキャリブレーションファイルに入力。
- 4 ☐ Editにチェックを入れ、X+のスケール係数を変更する。
- 5 OK判定（ $\pm 0.8\%$ ）ができるまで1～4を繰り返す。
（Excel Fileは適宜必要箇所をcopy&pasteして使用する）



| 現在のスケール係数 | 計測した長さ | 格子の数 | 理論上の長さ | 補正後のスケール係数 | 判定 |
|--------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------|----------------|
| Current ScalingFactor(%) | LineProfile Distance(nm) | Lattice Number | Theoretical Distance(nm) | Corrected ScalingFactor(%) | Residual Error |
| 実験前の値 → 117.6 | 121 | 7 | 123.9 | 114.8474576 | NG 2.341% |
| 115 | 123.8 | 7 | 123.9 | 114.9071832 | OK 0.081% |
| 115 | 107.1 | 6 | 106.2 | 115.9745763 | NG 0.847% |
| 115.4 ← | 124.2 | 7 | 123.9 | 115.6794189 | OK 0.242% |
| 92 | 110.7 | 6 | 106.2 | 95.89830508 | NG 4.237% |
| 94.5 | 107.5 | 6 | 106.2 | 95.65677966 | NG 1.224% |
| 95.5 | 106.4 | 6 | 106.2 | 95.67984934 | OK 0.188% |

この結果付近の値を次のPiezo Constとして入力。



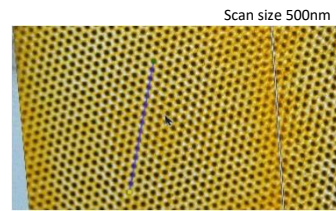
- 6 どの辺でも同じ長さになっているか確認。
- 7 左端へ移動。同様にX-のスケール係数を決定する。
- 8 上端へ移動。同様にY+のスケール係数を決定する。
- 9 下端へ移動。同様にY-のスケール係数を決定する。
- 10 Change Valuesで変更を保存する。

※ X+,X-を決定するとき(左右で計測するとき)は、Yは中心と同じはずなので確かめる程度でよい。
(Y+,Y-を決定するとき)上下で計測するとき)は、X方向は確かめる程度でよい。

③ Parameter3_Nonlinear Scaling for Scan Size(%)を決定 (Scan Size を変更して中心で測定)

0 ステージ中央に移動する。Scan Size 200nmでScanし、正しくキャリブレーションされているか確認する。

- 1 Scan Sizeを 500nmに変更し中心でドリフトがおさまるまでScan。(Pixelは120)
- 2 UMEX ViewerでReload、LineProfileで計測。(格子数12~14あたりで計測するとよい)
- 3 Excelのキャリブレーションファイルに入力。
- 4 ☐Editにチェックを入れ、XのScaling Factorの値を変更する。
- 5 OK判定 ($\pm 0.8\%$) がでるまで1~4を繰り返す。(Excel Fileは適宜必要箇所をcopy&pasteして使用する)
- 6 同様にYのScaling Factorの値を決定する。
- 7 Change Valuesで変更を保存する。



200nmで固定

Parameter1 Parameter2 Parameter3

StageOffset Rescaling for ScanSize (%)

☒ Edit Y+ 117.6 X+ 117.6

X- 92.0 Y- 92.0

Nonlinear Scaling for Scan Size (%)

☒ Edit X 50.0 Y 50.0

BaseScanSize (nm)

200

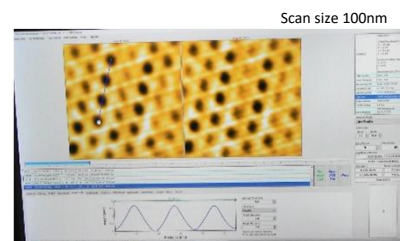
現在のPiezo Const Base Scan Size 現在のScan Size 現在のScaling Factor ラインプロファイル距離 格子の数 を入力。

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|--------------------------|-------|------------------|-------------|-------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|--|-------------|----------------------------|--------------------------|
| 95 | PiezoConst(nm/V) | 31.7 | BaseScanSize(nm) | 200 | Current ScanSize(nm) | 500 | Current ScalingFactor(%) | 60 | LineProfile Distance(nm) | 225.1 | Lattice Number | 13 |
| 96 | Theoretical Distance(nm) | 230.1 | PiezoConst_1st | 30.73059104 | BaseScanSize Voltage(V) | 6.309148285 | Current ScanSize Voltage(V) | 15.12639798 | Target Voltage for Current ScanSize(V) | 14.79770615 | Corrected ScalingFactor(%) | 81.6319 |
| 97 | | | | | | | | | | | | Residual Error NG 2.221% |
| 100 | PiezoConst(nm/V) | 31.7 | BaseScanSize(nm) | 200 | Current ScanSize(nm) | 500 | Current ScalingFactor(%) | 85 | LineProfile Distance(nm) | 224.2 | Lattice Number | 13 |
| 101 | Theoretical Distance(nm) | 230.1 | PiezoConst_1st | 30.08952095 | BaseScanSize Voltage(V) | 6.309148285 | Current ScanSize Voltage(V) | 14.7655154 | Target Voltage for Current ScanSize(V) | 14.36694765 | Corrected ScalingFactor(%) | 128.9579998 |
| 102 | | | | | | | | | | | | Residual Error NG 2.632% |
| 106 | PiezoConst(nm/V) | 31.7 | BaseScanSize(nm) | 200 | Current ScanSize(nm) | 500 | Current ScalingFactor(%) | 115 | LineProfile Distance(nm) | 234 | Lattice Number | 13 |
| 107 | Theoretical Distance(nm) | 230.1 | PiezoConst_1st | 29.55558824 | BaseScanSize Voltage(V) | 6.309148285 | Current ScanSize Voltage(V) | 14.4995497 | Target Voltage for Current ScanSize(V) | 14.74530478 | Corrected ScalingFactor(%) | 87.14785531 |
| 108 | | | | | | | | | | | | Residual Error NG 1.667% |
| 110 | PiezoConst(nm/V) | 31.7 | BaseScanSize(nm) | 200 | Current ScanSize(nm) | 500 | Current ScalingFactor(%) | 92 | LineProfile Distance(nm) | 228.6 | Lattice Number | 13 |
| 111 | Theoretical Distance(nm) | 230.1 | PiezoConst_1st | 29.96094216 | BaseScanSize Voltage(V) | 6.309148285 | Current ScanSize Voltage(V) | 14.70028789 | Target Voltage for Current ScanSize(V) | 14.60445911 | Corrected ScalingFactor(%) | 102.6935767 |
| 112 | | | | | | | | | | | | OK 0.650% |
| 114 | | | | | | | | | | | | |
| 115 | | | | | | | | | | | | |
| 116 | | | | | | | | | | | | |

補正後のScaling Factor。
これをもとに次の
Scaling Factor を入力。

◎校正表に結果を記入する。

※Zの校正は別にActinで行う。



ウルトララージスキャナーの校正

【350nmビーズ使用の場合（recommended）】

- ①350nm ポリスチレンビーズ原液をMQで1/10に希釈する。
※原液をよく振ってからチューブにとる。
- ②1分間超音波をかける。
- ③マイカをはがし、0.5 μ lのせ、自然乾燥させる。（数分間）
- ④30分間真空引きする。
- ⑤ SA-Buffer(150mM NaCl, 2mM CaCl₂ , 10mM HEPES-NaOH.pH7.4)で観察、校正する。
※校正手順は「アネキシンを用いた非線形キャリブレーション」に従う。
※Base Scan Size 5000に設定する。
※Q値制御回路をUltra wideにする。（026の装置）
※マイカの淵の密集しているところにアプローチするとよい。

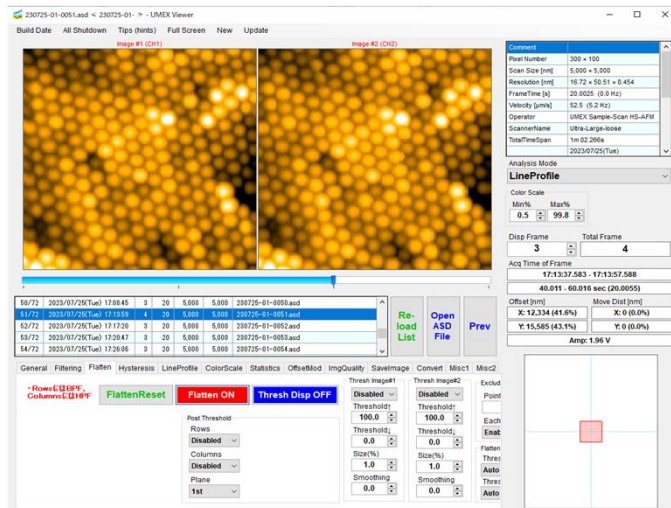


真空引き
(225ドラフト内)

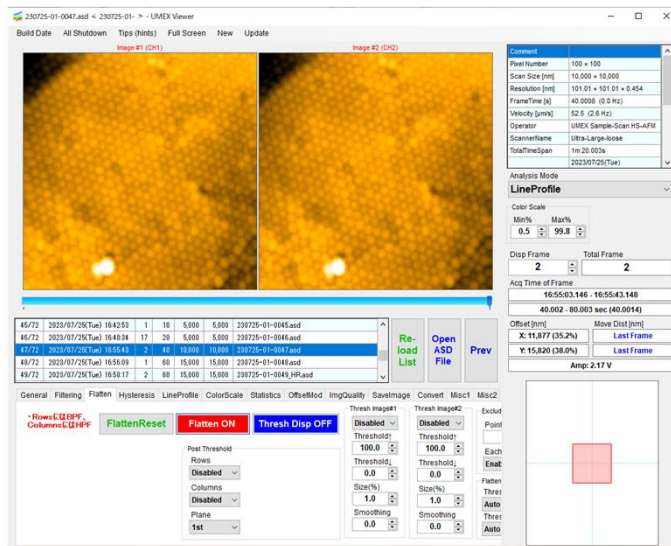


使用ビーズ：
Polybead®
Polystyrene 0.35
Microspheres
Cat # 07306
Polysciences, Inc.

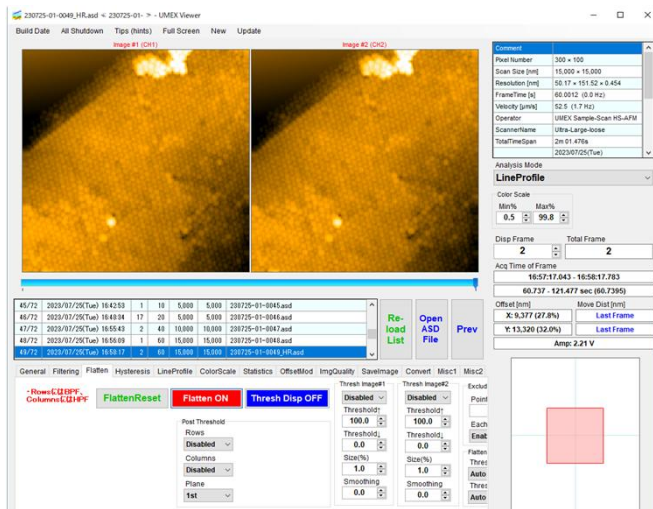
・見え方の参考画像



ScanSize_5000nm



ScanSize_10000nm



ScanSize_15000nm

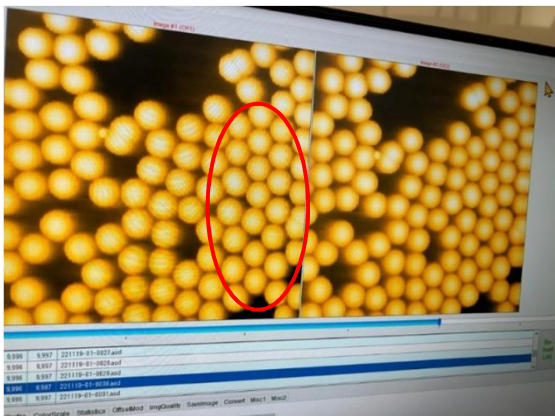
【1 μ mビーズ使用の場合（optional）】

- ①1 μ m-Silica beads原液をMQで1/100に希釈する。
※原液をよく振ってからチューブにとる。
- ②マイカをはがし、1/10000 APTESを2 μ l のせ、3分待つ。
- ③60 μ l MQでリンスする。
- ④希釈したビーズ液を1分間超音波。
- ⑤ビーズ液 10 μ lをのせる。（リンスする感じで）
- ⑥自然乾燥する。（乾くまで放置する。1時間以上かかる。）
- ⑦1時間真空引きをする。
- ⑧MQで観察、校正する。

※Base Scan Size 10000に設定。

※その他は350nmビーズを使用した時と同じ方法。

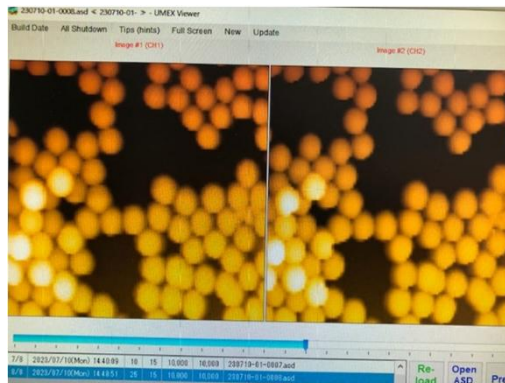
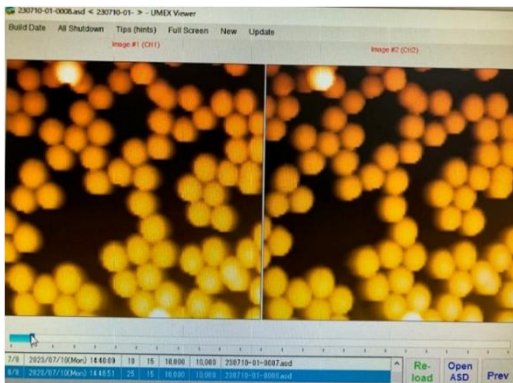
・見え方の参考画像



○で囲んだ部分くらい密集しているところを探しXYを校正する。



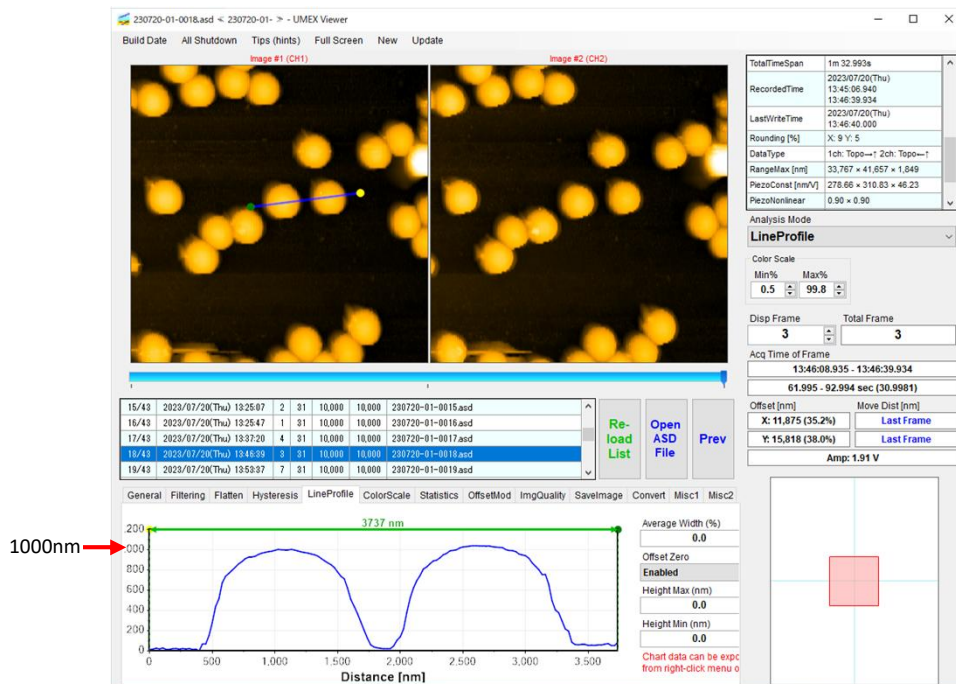
使用ビーズ：
Polybead®
Silica Microspheres
1.0+/-0.05micron
Microspheres
Cat # 24326
Polysciences, Inc.



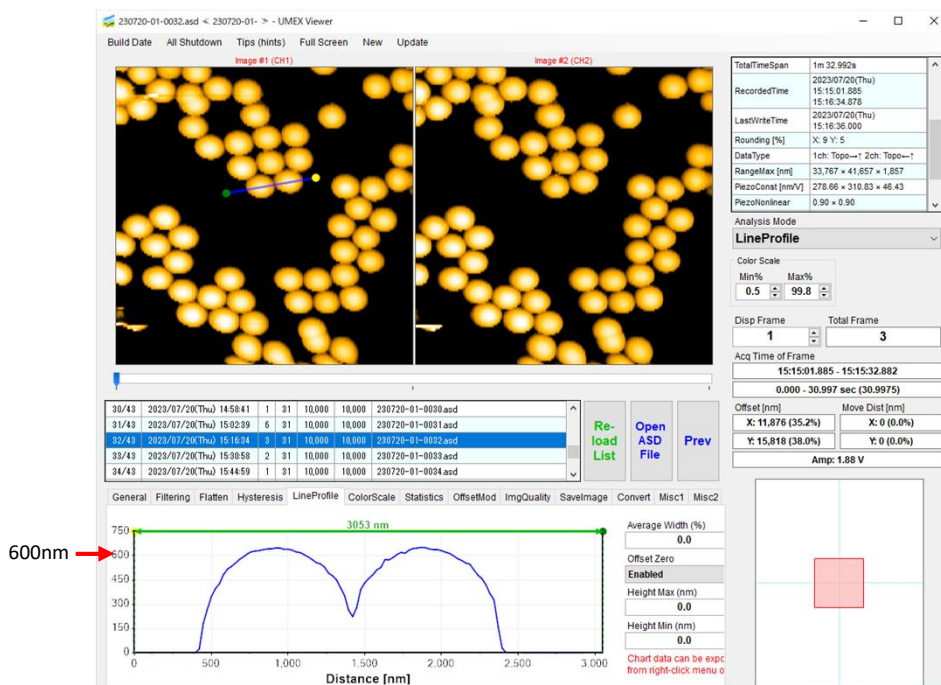
密集していない。
まばら。

【参考：Zの校正】

Zの校正は1 μm ビーズのまばらなところを利用して行った。



針が基板に届いている。高さ1000nm。



針が基板に届いていない。
同サンプルで、同じようなPiezo Constでも高さが600nmという全く違う結果になってしまうので要注意。