



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

## VÝZKUM POKROČILÝCH MIKROSKOPICKÝCH A LITOGRAFICKÝCH TECHNIK AFM

RESEARCH OF ADVANCED MICROSCOPIC AND LITHOGRAPHIC AFM TECHNIQUES

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kamil Vaněk

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zdeněk Nováček, Ph.D.

BRNO 2022



## Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství  
Student: **Kamil Vaněk**  
Studijní program: Fyzikální inženýrství a nanotechnologie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Zdeněk Nováček, Ph.D.**  
Akademický rok: 2021/22

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

### **Výzkum pokročilých mikroskopických a litografických technik AFM**

#### **Stručná charakteristika problematiky úkolu:**

Na Ústavu fyzikálního inženýrství je vyvíjeno několik unikátních zařízení pro rastrovací sondovou mikroskopii. Cílem uvedené práce je implementace duté měřicí sondy a možnosti lokálně kontrolovat atmosféru v těsné blízkosti hrotu. Přivedený plyn je možné dále ovlivňovat elektrickým polem, jehož značná intenzita v blízkosti hrotu může vést až k disociaci molekul pracovního plynu.

#### **Cíle bakalářské práce:**

Rešeršní studie mikrofluidních aplikací ve spojení s AFM.

Návrh, sestavení a testování zařízení pro kontrolu atmosféry v pracovním prostoru mikroskopu AFM.

Srovnání výsledků měření AFM v atmosférických podmínkách s výsledky měření ve vakuu a při přivádění plynu dutou sondou.

#### **Seznam doporučené literatury:**

MEYER, Ernst, Hans Josef HUG a Roland BENNEWITZ. Scanning probe microscopy: the lab on a tip. Berlin: Springer, c2004. Advanced texts in physics. ISBN 3540431802.

VŮJTEK, Milan, Roman KUBÍNEK a Miroslav MAŠLÁŇ. Nanoskopie. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3102-4.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2021/22

V Brně, dne

L. S.

---

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.  
ředitel ústavu

---

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.  
děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá testováním a úpravami environmentální komory pro mikroskop atomárních sil NTegra Prima a implementací dutých sond FluidFM do tohoto mikroskopu. Funkční implementace dutých sond do NTegra Prima spolu s možností řídit okolní atmosféru umožní provádět nanolitografické experimenty s danou sestavou.

Nejprve je zmapován vývoj dutých sond a systému FluidFM. Jsou zmíněny jejich vlastnosti a uplatnění. V další části je představena použitá AFM sestava a environmentální komora. Je popsáno testování komory a navržené a realizované úpravy této komory. Byla úspěšně zajištěna plná funkčnost environmentální komory. Dále jsou uvedeny a zhodnoceny výsledky měření v nízkém vakuu. Na závěr je prezentována úspěšná implementace duté sondy do mikroskopu a výsledky měření topografie touto sondou. Výsledky tohoto měření dutou sondou jsou porovnány s měřením sondou normální.

### **Klíčová slova**

Mikroskopie atomárních sil, fluidní silový mikroskopie, FluidFM, duté sondy, environmentální komora, NTegra Prima, vakuum

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis is about testing and improving the environmental chamber for atomic force microscope NTegra Prime and implementing hollow probes FluidFM to this microscope. A functional implementation of hollow probes to NTegra Prima together with the ability to control the atmosphere allows us to carry out nanolithography experiments with this setup.

At first, the development of hollow probes and the system FluidFM is mentioned together with properties and applications. In next chapter, the AFM setup and environmental chamber is introduced. Testing of the chamber is described and enhancements presented. Next, the results of measurements in vacuum are mentioned. At the end, the implementation of hollow probes together with measurements are presented. These results are compares with measurement results with normal probe.

### **Key words**

Atomic force microscopy, fluidic force microscopy, FluidFM, hollow probes, environmental chamber, NTegra Prima, vacuum

VANĚK, Kamil. *Výzkum pokročilých mikroskopických a litografických technik AFM*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/140787>.  
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav fyzikálního inženýrství. Vedoucí práce Zdeněk Nováček.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Výzkum pokročilých mikroskopických a litografických technik AFM Ústavu fyzikálního inženýrství** vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených v seznamu, který tvoří přílohu této práce.

.....  
Datum

\_\_\_\_\_  
*Jméno a příjmení*

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji tímto Ing. Zdeňku Nováčkovi, Ph.D. za všechny odborné rady a připomínky v průběhu tvorby této bakalářské práce a asistenci realizaci navrhnutých řešení. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za podporu během mého studia.



# OBSAH

ÚVOD.....	11
1 Mikroskopie atomárních sil.....	12
1.1 Základní principy.....	12
1.2 Sondy.....	14
1.3 Techniky SPM s aperturou hrotu.....	16
1.3.1 Scanning near-field optical microscopy (SNOM).....	16
1.3.2 Scanning ion conductance microscopy (SCIM).....	17
1.3.3 Scanning electrochemical microscopy (SECM).....	18
2 Vývoj dutých sond pro AFM.....	19
2.1 Sondy z nanopipet.....	19
2.2 Dip-Pen (DPN).....	20
2.3 Nanodispensing (NADIS).....	21
2.4 Fountain Pen Probe.....	23
2.5 Nanofountain Pen (NFP).....	24
2.6 NADIS druhé generace.....	26
3 FluidFM.....	28
3.1 Vývoj prvního prototypu.....	29
3.1.1 Výroba dutých sond.....	29
3.1.2 Výroba držáku dutých sond.....	31
3.1.3 Ovládání mikrofluidního toku.....	32
3.1.4 Ovládání posuvu vzorku a software.....	33
3.2 Aplikace.....	33
3.3 Produkty.....	35
3.4 Další duté sondy.....	38
3.4.1 Femtopipeta.....	38
3.4.2 BioProbe.....	39
3.5 Shrnutí.....	41
4 Environmentální komora a úpravy.....	43
4.1 AFM sestava.....	43
4.2 Environmentální komora pro NTegra Prima.....	45
4.3 Testování a úpravy environmentální komory.....	47
4.3.1 Vyosení manipulátorů.....	47
4.3.2 Testování vakua.....	48
4.3.3 Posun při vakuování a optický mikroskop.....	49
4.3.4 Návrh nástavce pro environmentální komoru.....	50
4.3.5 Návrh nových koncovek.....	52
5 Měření ve vakuu a implementace FluidFM sondy.....	55
5.1 Měření topografie ve vakuu.....	55
5.2 Měření na nefunkčním UV senzoru grafen/GaN.....	56
5.3 Implementace FluidFM sond a měření kalibrační mřížky.....	59
ZÁVĚR.....	62
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	63



## ÚVOD

Duté neboli mikrofluidní měřicí sondy pro mikroskopii atomárních sil představují další pokrok v této neustále se rozvíjející oblasti mikroskopie. Mikroskopie atomárních sil neboli AFM již existuje více jak třetinu století [1] a za tu dobu se stala standardem při zkoumání topografie a vlastností povrchů. Mikrofluidní sondy obsahují integrované mikrokanálky a aperturu v blízkosti hrotu. Umožňují k povrchu vzorku dodávat prakticky libovolnou tekutinu, nebo tekutinu z povrchu naopak extrahovat, a to za současného zachování klíčových vlastností mikroskopie atomárních sil. Vznikla tím nová odnož mikroskopie atomárních sil – fluidní silová mikroskopie. Použití tato mikroskopie nachází hlavně v biologickém výzkumu. Systém FluidFM firmy Cytosurge je synonymem fluidní silové mikroskopie a je zdaleka nejrozšířenějším systémem v této oblasti. Zaměřuje se především na vývoj produktů využívajících fluidní silové mikroskopie pro zmíněný biologický výzkum.

Úspěšná implementace duté měřicí sondy do AFM sestavy, kterou disponuje Ústav fyzikálního inženýrství fakulty strojního inženýrství VUT, by umožnila provádět nové experimenty. V ideálním případě by se takto upravená sestava dala použít pro selektivní depozici nanostruktur v atmosféře nebo vakuu.

Předložená bakalářská práce nejprve popisuje historii vývoje dutých sond a jejich použití a představuje systém FluidFM. Dále je v jejím rámci testována environmentální komora pro kontrolu atmosféry na AFM sestavě v laboratoři povrchů na Ústavu fyzikálního inženýrství. Jsou navrženy a realizovány úpravy této komory pro zajištění a zlepšení její funkčnosti. Poté je prezentována implementace dutých sond do zmíněné sestavy a její testování.

V rešeršní studii jsem vycházel především ze článků publikovaných v odborných periodikách za několik posledních let. Jednalo se například o Applied Physics Letters, Journal of Applied Physics či časopis Science. Nevycházelo se ale pouze z článků. Při mapování vývoje FluidFM se stala cenným zdrojem dizertační práce jednoho ze zakladatelů firmy Cytosurge – Pascala Behra [2]. Praktická část práce často navazuje na předešlé práce mých kolegů. Zmínil bych především Ing. Aleše Cáhlika, jenž v rámci své bakalářské práce navrhnul celou environmentální komoru [3].

# 1 Mikroskopie atomárních sil

## 1.1 Základní principy

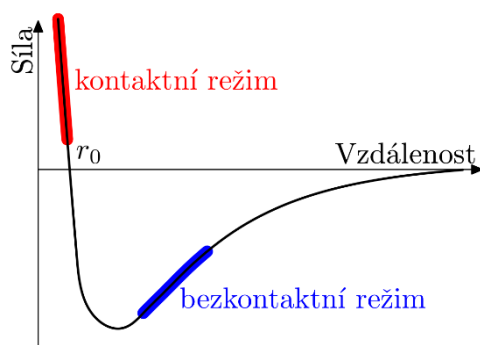
K zobrazování povrchů se používají různé mikroskopické techniky. *Atomic force microscopy* neboli AFM je jednou z nich. Technika využívá skenování ostrým hrotem po povrchu vzorku a silového působení mezi nimi primárně pro určení topografie vzorku. Byla představena roku 1986 týmem Gerda Binniga [1] a stala se nedílnou součástí výzkumu nanosvěta. Technika vystupuje v nespočtu publikací a věnují se jí knihy jako například [4] [5] [6] [7] [8].

AFM se vyvinula ze *scanning tunneling microscopy* (STM) [9]. STM využívá měření tunelovacího proudu mezi vodivým vzorkem a skenujícím hrotem pro určení jejich vzájemné vzdálenosti, a tedy měření topografie vzorku. AFM a STM patří do odvětví mikroskopie zvané *scanning probe microscopy* (SPM), které zahrnuje různé techniky, jež skenováním speciálními sondami v blízkosti vzorku a měřením jejich různých vzájemných interakcí získávají informace o jeho topografii a případně i dalších vlastnostech. Některé další vybrané druhy SPM budou zmíněny později (viz Techniky SPM s aperturou hrotu). Zatímco technika AFM skýtá mnohé výhody oproti optické či elektronové mikroskopii, tak s sebou nese i jisté nevýhody. Jako výhody uveďme například, že není limitována difrakční mezí, poskytuje 3D obraz a umožňuje určovat kromě topografie například i mechanické a elektrické vlastnosti vzorku. Její nevýhodou je třeba nutnost vysoké mechanické stability a přesného řízení pohybu, menší maximální rozsah zobrazované oblasti či pomalejší měření. Výhodné je tedy mikroskopické techniky vhodně kombinovat.

AFM využívá silového působení mezi povrchem vzorku a hrotem a nevyžaduje tedy vodivý vzorek jako STM. Působící síly se dělí na ty krátkého (vzdálenost v jednotkách Å) a dlouhého (vzdálenost v jednotkách nm) dosahu. Mezi nejvýznamnější síly krátkého dosahu patří odpuzivé síly mezi iontovými jádry a síly plynoucí z Pauliho vylučovacího principu při překrytí vlnových funkcí elektronů. Nejvýznamnější silou dalekého dosahu je síla van der Waalsova. Závislost velikosti těchto sil mezi dvěma neutrálními atomy na jejich vzájemné vzdálenosti bývá nejčastěji modelována Lennard-Jonesovým potenciálem  $U_{LJ}$ . Ten má tvar

$$U_{LJ}(r) = 4U_0 \left[ \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left( \frac{r_0}{r} \right)^6 \right], \quad (1)$$

kde  $r$  je vzdálenost atomů,  $U_0$  je hloubka potenciálové jámy a  $r_0$  je poloha, v níž je potenciál nulový. Závislost odpuzivých sil se v tomto případě uvažuje úměrná  $1/r^{12}$  a sil přitažlivých jako  $1/r^6$  [7]. Mezi další síly, které mohou působit mezi hrotem a vzorkem, patří například síly elektrostatické, magnetické, třecí či adhezní. Dále se v atmosférických podmínkách kvůli zkondenzované vodě mezi vzorkem a hrotem vytváří vodní meniskus, který zapříčiňuje působení kapilárních sil.

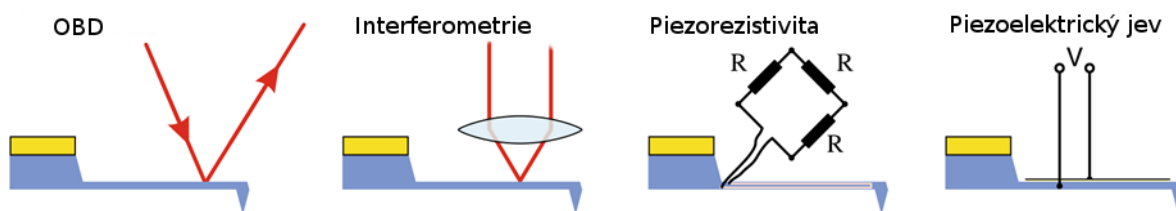


Obr. 1.1 Průběh meziatomárních sil [6]

Měřicí módy AFM lze rozdělit podle toho, jakou silovou interakci mezi hrotem a vzorkem využívají jako hlavní. AFM může pracovat v kontaktním módu, který je nejčastěji statický a pro měření využívá odpudivých sil krátkého dosahu. Topografie vzorku se určuje z ohnutí nosníku a měření může probíhat v režimu s konstantní přitlačnou silou, či v režimu konstantní výšky základny sondy (čipu) nad vzorkem. Další hlavní měřicí mód je mód bezkontaktní, jenž využívá sil dlouhého dosahu (1–10 nm od povrchu). Tyto síly jsou slabší, a proto se nejčastěji měří v dynamickém režimu, kdy je hrot rozkmitáván a topografie vzorku se určuje ze změn těchto kmitů způsobenými přítomnými silami dlouhého dosahu. Tento mód na rozdíl od kontaktního nepoškozuje či neznečišťuje vzorek nebo hrot. Protože musí být hrot rozkmitáván v blízkosti vzorku, může ale dojít v atmosférických podmínkách k přichycení hrotu ke z kondenzované vodě na povrchu, což naruší měření. Proto se pro bezkontaktní měření volí sondy s kratším nosníkem a vyšší tuhostí, zatímco v kontaktním módu se používají sondy s delšími nosníky a nižší tuhostí (pro význam nosníku a tuhosti sondy viz Sondy). Za zmínku stojí ještě mód poklepový, který je kombinací obou předešlých módů. Zajišťuje lepší rozlišení než mód kontaktní a také obchází zmíněné problémy bezkontaktního módu při měření v atmosféře [10].

Silové působení tedy mění ohyb sondy a tuto změnu je třeba detekovat. Pro detekci se používají různé metody. Na počátku se ohyb měřil komplikovaně – samostatnou STM sondou umístěnou na sondě AFM [1], jelikož nebyly známé jiné metody pro detekci nanometrových změn polohy. Nyní je nejrozšířenější metoda *optical beam deflection* (OBD) [11], při které je na sondu svíceno laserem, jenž se odráží do fotodetektoru se čtyřmi segmenty. Dle velikosti dopadajícího světla do jednotlivých segmentů lze stanovit míru ohybu či torze sondy nebo změnu jejího kmitání. Další možnosti detekce představuje například využití interferometrie [12], piezorezistivity [13], či piezoelektrického jevu (*tuning fork*) [14]<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Piezoelektrický/piezorezistivní jev označuje změnu elektrického potenciálu/elektrického odporu v určitých materiálech při jejich mechanickém namáhání.



Obr. 1.2 Schéma způsobů detekce ohybu [7]

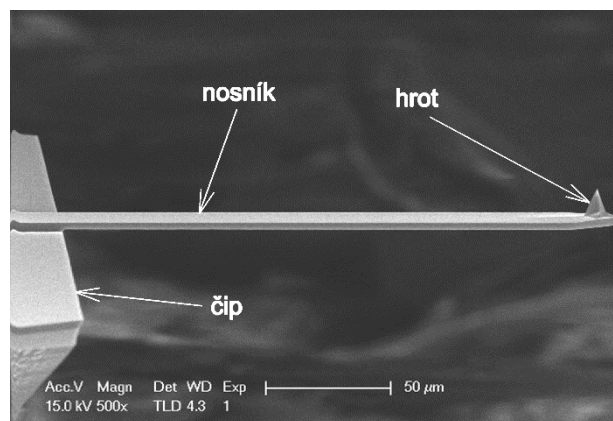
Měření AFM vyžaduje značnou mechanickou stabilitu a izolaci systému od vnějších vibrací pro zajištění potřebné přesnosti při detekci malých sil mezi hrotem a vzorkem. Podíl výstupní a vstupní amplitudy vibrací musí být asi  $10^{-6}$  pro dosažení atomárního rozlišení. Proto je konstrukce sestavy velice pevná a je většinou doplněna jak pasivními (gumové podložky, pružinové zavěšení, ...) tak aktivními tlumicími prvky (aktivní antivibrační stůl). Aktivní tlumicí prvky monitorují vnější vibrace a generují vibrace protichůdné pro jejich vyrušení.

Pro skenování hrotem po vzorku a jejich přibližování k sobě se používá jemných posuvů nejčastěji realizovaných pomocí skenerů využívajících piezoelektrický jev. Rozsah těchto skenerů je až přes  $100\ \mu\text{m}$  v osách skenu (X, Y) a v řádu desítek  $\mu\text{m}$  v ose kolmé na povrch vzorku (Z). Rozlišení skenování je pro větší zorná pole ( $>100\ \mu\text{m}$ ) v jednotkách nanometrů a pro malá zorná pole (stovky nm) až v řádu jednotek pikometrů. Pro polohování vzorku před měřením se využívá hrubých posuvů, jež mohou být zajištěny například pohybovými šrouby.

AFM se používá na měření strukturních, elektrických, mechanických či tepelných vlastností nanomateriálů. Používá se například v polovodičovém průmyslu pro kontrolu výrobků. AFM může také modifikovat povrch vzorků ať už chemicky či fyzicky a fungovat tedy jako nanolitografická technika. Uplatnění nachází AFM i v biologii od zkoumání struktury, procesů, interakcí a mechanických vlastností jednotlivých buněk a biomolekul až po celé tkáně.

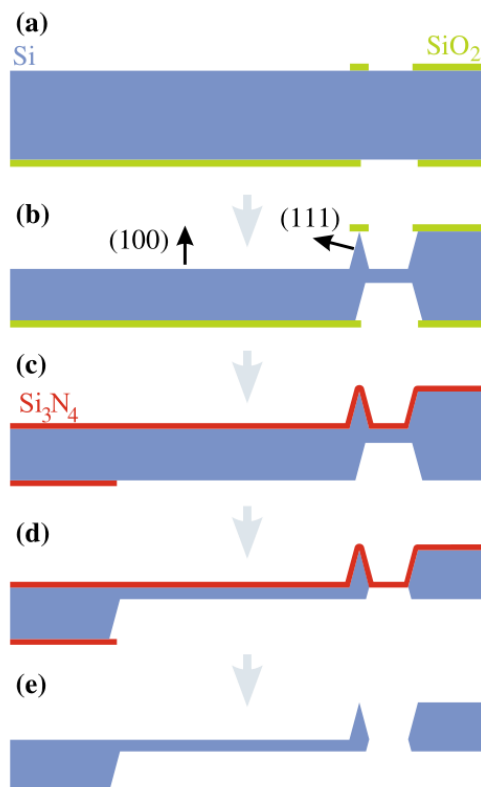
## 1.2 Sondy

Na Obr. 1.3 je příklad sondy atomárních sil. Sonda jako celek se v angličtině často nazývá *probe*, *cantilever* či *tip*. Zároveň se označení *cantilever* a *tip* používají pro popis konkrétních částí sondy. To může způsobit nejasnosti v popisu. V této práci budeme celek označovat jako sondu či *cantilever*. Názvy jednotlivých částí sondy pro účely této práce jsou patrné z Obr. 1.3. Čip slouží k manipulaci se sondou pomocí pinzety a její ukotvení v mikroskopu. Nosník, který se na něj napojuje, nese samotný ostrý hrot.



Obr. 1.3 Příklad AFM sondy [15]

AFM sondy se vyrábějí technikami adaptovanými z mikroelektronického průmyslu pro výrobu MEMS (*microelectromechanical systems*) zařízení. Nejčastěji se vyrábějí z křemíku, oxidu křemičitého či nitridu křemičitého, a to na křemíkových *waferech*<sup>2</sup> užitím fotolitografických metod. Jsou zprávy o výrobě sond čistě z polymerů, konkrétně fotoplastu SU-8 [16], ale tyto sondy nejsou komerčně rozšířené.



Obr. 1.4 Schéma standardní výroby AFM sondy [7]

Nejrozšířenější jsou křemíkové sondy pro OBD metodu detekce [7]. Jejich výroba je založena na anizotropním mokřím leptání pomocí KOH. Krystalografická rovina (100) křemíku je leptána rychleji než rovina (111). Proces je patrný z obrázku 1.4. Na Si *waferech* (100) se litografickými metodami vytvoří strukturovaná vrstva SiO<sub>2</sub> vymezující čip, nosník a pozici hrotu (a). Následuje mokřé leptání odhalených částí křemíku (b). Dochází k rychlému leptání ve směru (100), ale pod okraji vrstev oxidu se formují zkosení ve směru pomalu leptané roviny (111), což vede až k vytvoření hrotu pod jednou z těchto vrstev. Dále je celý vrch *waferech* a spodní část náležící čipu pokryta ochrannou vrstvou Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (c). Druhé mokřé leptání spodní části ztenčí odkrytou část *waferech*, tím vytvoří nosník a oddělí sondu od zbytku *waferech* (d). Nakonec je odstraněna leptáním vrstva nitridu a sonda je z *waferech* uvolněna. Špičky hrotů hotových *cantileverů* jsou často dále pokryty diamantovým povlakem pro zvýšení jejich odolnosti vůči poškození a na vršek nosníku je nanášena vrstva zlata či hliníku pro zvýšení odrazivosti pro OBD.

Nosníky sond jsou často vyráběny buď obdélníkové, nebo tvaru V pro snížení jejich torze při působení laterálních sil na hrot. Délka obdélníkového nosníku sond vyrobených zmíněným

<sup>2</sup> tenký disk polovodiče používaný jako základ pro elektronické komponenty či mikroobvody

postupem se zpravidla pohybuje v rozmezí 100–450  $\mu\text{m}$ , šířka 10–40  $\mu\text{m}$  a tloušťka do 2  $\mu\text{m}$ . Pro určení velikosti působící síly na sondu z detekovaného ohybu jejího nosníku je třeba znát tuhost tohoto nosníku. Pro tuhost nosníku při malých ohybech platí analytický vztah [17]

$$k = \frac{3EI}{L^3}, \quad (2)$$

kde  $E$  je Youngův modul,  $I$  je ohybový moment setrvačnosti a  $L$  je délka nosníku. Pro obdélníkový průřez nosníků má  $I$  tvar [17]

$$I = \frac{wt^3}{12}, \quad (3)$$

kde  $w$  je šířka a  $t$  je tloušťka. Po dosazení vztahu (3) do rovnice (2) dostáváme analytický vztah pro tuhost nosníku obdélníkového průřezu

$$k = \frac{Ewt^3}{4L^3}, \quad (4)$$

Rozmezí dostupných tuhostí nosníků běžně vyráběných sond se pohybuje od 0,01 N/m do 50 N/m. Vzhledem k rozdílům v tloušťce a materiálových vlastnostech z výroby je udávaná tuhost nosníku sond (dále jen tuhost sond) od výrobce pouze orientační. Pro přesné určení tuhosti určité sondy je třeba užít experimentálních metod.

Jedna z významných experimentálních metod pro určení tuhosti dané sondy je Saderova metoda [18]. Ta umožňuje určit tuhost sondy bez znalosti Youngova modulu a tloušťky nosníku. Vyžaduje změřit pouze rezonanční frekvenci a činitel jakosti ( $Q$ -faktor) dané sondy v tekutině (nejčastěji vzduchu). Pro tuhost sondy s dlouhým nosníkem ( $L/w > 5$ ) obdélníkového průřezu a činitelem jakosti mnohem větším než 1 pak platí vztah

$$k = 0,1906\rho_f w^2 L Q_f \Gamma_{im}(\omega_f) \omega_f^2, \quad (5)$$

kde  $\rho_f$  je hustota tekutiny kolem *cantileveru*,  $\omega_{0,f}$  a  $Q_f$  je rezonanční frekvence a činitel jakosti sondy v tomto prostředí,  $\Gamma_{im}$  reprezentuje imaginární část hydrodynamické funkce  $\Gamma$  okolní tekutiny.  $\Gamma$  je závislá na Reynoldsově čísle dané tekutiny.

AFM sondy se nabízejí s různými průřezy nosníků a případně i více než jedním nosníkem na jednom čipu. Hroty sond se můžou lišit tvarem základny, poměrem výšky k šířce, zakřivením či umístěním na nosníku. Za zmínku stojí sférický hrot, který se díky větší a dobře definované kontaktní ploše se vzorkem využívá v biologii a materiálových vědách pro stanovení mechanických vlastností materiálů. Pro přesné měření topografie vzorku je zapotřebí vyšetřit tvar měřicího hrotu a s jeho znalostí provést dekonvoluci naměřeného obrazu.

### 1.3 Techniky SPM s aperturou hrotu

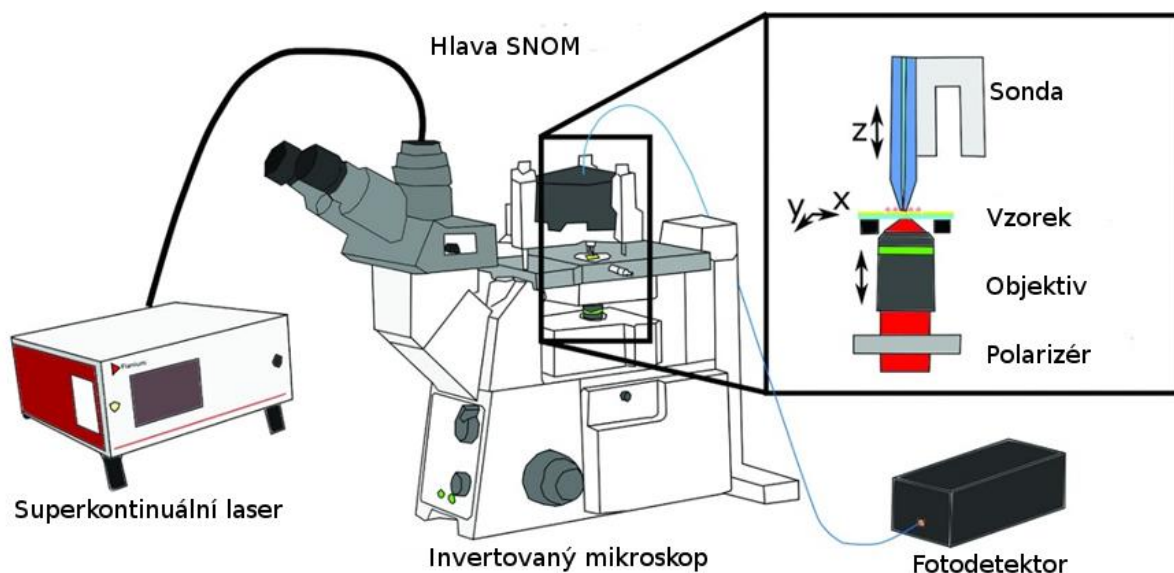
V této části budou představeny techniky SPM, které využívají hrot s aperturou. To je činí blízkými mikrofluidním aplikacím v AFM, jimiž se budeme zabývat dále v textu.

#### 1.3.1 Scanning near-field optical microscopy (SNOM)

Technika SNOM obchází difrakční limit klasické optické mikroskopie. Běžná optická mikroskopie pracuje ve vzdálenosti od zdroje světla  $d$  větší, než je použitá vlnová délka světla  $\lambda$  – pracuje v dalekém optickém poli. SNOM využívá blízkého optického pole ( $d < \lambda$ ) [19]. Používají se při ní sondy s pokovenými dutými hroty či hroty z optického vlákna pokrytého vrstvou kovu, do které je vytvořena apertura. Apertura má zpravidla průměr v řádu desítek nanometrů. Většinou měření probíhá tak, že se do sondy svítí laserem, sondou se skenuje v blízkosti povrchu vzorku (typicky pod 5 nm) a odražené nebo prošlé světlo z povrchu



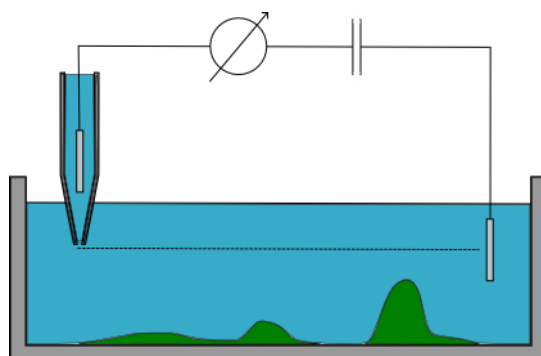
je přes optiku dalekého pole zachyceno na fotonásobiči. Princip techniky spočívá v omezení světla kovovou vrstvou do apertury užší než vlnová délka užitého světla, což vytváří za aperturou evanescentní vlny blízkého optického pole, které interagují s povrchem vzorku a tyto interakce jsou pozorovány v dalekém optickém poli. Rozlišení závisí na rozměrech apertury a vzdálenosti od povrchu vzorku. Využití technika nachází například při měření optických vlastností, chemické struktury nebo lokálního napětí materiálu.



Obr. 1.5 Schéma SNOM [20]

### 1.3.2 Scanning ion conductance microscopy (SCIM)

SCIM je zobrazovací metoda založená na užití nanopipet v kombinaci s elektrodami (více o mikro/nanopipetách viz Nanopipety v AFM) [21]. Používá se v elektrolytickém roztoku, do nějž se umístí jedna elektroda a druhá se umístí do nanopipety. Po vnoření nanopipety do elektrolytu se ustanoví proud iontů mezi elektrodami. Po přiblížení nanopipety k nevodivému povrchu je proud iontů procházející její aperturou omezen a pokles jeho velikosti odpovídá vzdálenosti od povrchu. Toho technika SCIM využívá jako odezvy pro měření topografie vzorků. Její rozlišení závisí na velikosti apertury a je horší než u AFM nebo STM. Uplatnění nachází nejčastěji v biologii pro zobrazování měkkých a vzorků jako buněk či tkání.



Obr. 1.6 Schéma techniky SCIM [22]

### 1.3.3 Scanning electrochemical microscopy (SECM)

Technika SECM je užitečná pro mapování elektrochemických vlastností vzorků [23]. Jako sondu používá tenké kovové vlákno zapouzdřené v nanopipetě – *ultramicroelectrode* (UME). Tato sonda ponořena do redoxně aktivního elektrolytu a je na ni přivedeno záporné napětí. Pokud je toto napětí dostatečné, způsobí elektrochemickou reakci, kde kationty elektrolytu přijímají elektrony z UME (redukují se). Výsledkem je měřený kladný proud závislý na míře difuze dalších kationtů schopných redukce k UME. V prvním měřicím módu SECM je proud modulován podle toho, zda je sonda přiblížena k povrchu vodiče či izolátoru. V případě vodivého vzorku odevzdávají zredukované kationty elektrony do vodiče, mohou se opět podílet na přenosu elektronů z UME a měřený proud se zvyšuje. Pro případ, že je sonda v blízkosti izolátoru se omezuje prostor, kudy mohou kationty k UME difundovat, a měřený proud se snižuje. Tomuto módu se říká *feedback* mód SECM. Ve druhém měřicím módu pracuje sonda jako generátor nebo kolektor. Mód nevyužívá přímo částic elektrolytu pro vznik proudu, ale částic generovaných u UME či povrchu vzorku při dostatečném napětí mezi sondou a vzorkem. Částice se buď generují na UME a reagují s povrchem vzorku (mód generátoru) nebo se naopak generují povrchu vzorku a reagují s UME (mód kolektoru). SECM může skenovat v konstantní výšce, ale pro skenování v kontrolované vzdálenosti od vzorku je třeba tuto metodu kombinovat s SCIM [24] či AFM [25]. SECM se používá při pozorování a ovládnutí elektrochemických redoxních reakcí s vysokou prostorovou přesností a uplatňuje se v chemii, biologii a materiálových vědách [26].

## 2 Vývoj dutých sond pro AFM

### 2.1 Sondy z nanopipet

Asi nejpřímochařejší možností, jak do AFM integrovat mikrofluidní prvky, bylo využít tažených pipet z křemenného či borokřemičitého skla jako sond. První pipety s hrotem s aperturou o vnějším průměru v řádu několika mikrometrů (mikropipety) byly představeny již na počátku 20. století [27]. Později vyvinuté nanopipety dosahují průměru hrotu v řádu desítek nanometrů [28].

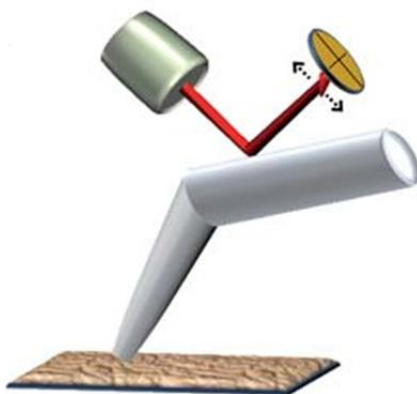
Pipety se vyrábějí se pomocí specializovaného nástroje zvaného *pipette puller*. Tenké trubičky zmíněných skel jsou v jedné oblasti zahřívány žhaveným vláknem nebo laserem a natahovány, dokud se v zahřátém místě skleněná trubička tečením nerozdělí, což zanechá dvě trubičky s tenkými dutými hroty v místě oddělení. Tloušťka hrotů a jejich apertura závisí na teplotě od vlákna či laseru, rychlosti tažení a jeho finální síle, prodlevě mezi vypnutím ohřevu a finálním tažením, užitém skle a tloušťce jeho stěny a okolní teplotě a vlhkosti [28] [29]. Pro výrobu mikropipet se většinou preferuje borokřemičité sklo, zatímco nanopipety se vyrábějí ze skla křemenného. Borokřemičité sklo má sice nižší teplotu tání, ale pipety z něj vyrobené nedosáhnou průměru apertury pod 80 nm. U pipet z křemenného skla lze dosáhnout průměru otvoru pod 20 nm. Protože však toto sklo má vyšší teplotu tání, je třeba pro zahřátí použít při výrobě místo žhaveného vlákna laser [28] [29] [30]. Výroba je jednoduchá, ale je kusová a vyrobené průměry hrotů nejsou konzistentní. Parametry pipet musí být ověřeny například pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM).



Obr. 2.1 Nanopipeta [28]

Mikropipety a nanopipety jsou velmi rozšířené v analytické chemii, molekulární a buněčné biologii a při vývoji senzorů. Používají se zde například pro přesnou manipulaci s malým objemem tekutin, k vstřikovávání látek do buněk, k manipulaci s buňkami nebo pro detekci fyziologických signálů (*patch clamp*) [29] [31]. Také z nich byly úspěšně vyrobeny silové sondy a používají se v SPM jako třeba SICM, SECM, SNOM či právě AFM [28] [29] [30] [32].

Pro použití v AFM se nanopipety zahřívají ohnou, aby připomínaly tvar *cantileveru*. Na vrchní straně se za ohybem vyleští malá plocha, která se následně pokryje hliníkovou vrstvou, pro odraz laserového paprsku do fotodetektoru. Tuhost materiálu pipety se pohybuje v řádu 10 N/m a může být modifikována změnou tloušťky stěny pipety. Ještě je třeba uvést, že na sondu se nanáší tenká vrstva kovu, která na hrotu slouží jako apertura pro SNOM a zamezuje opotřebení hrotu při AFM měření [33] [34].

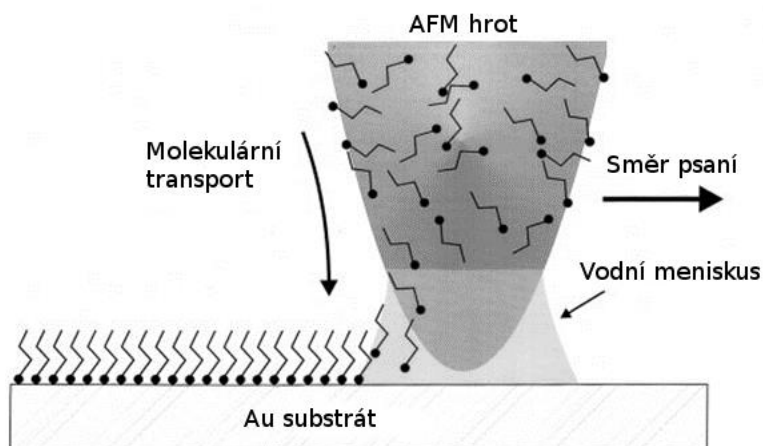


Obr. 2.2 Schéma nanopipety integrované do AFM [30]

Nanopipeta byla v kombinaci s AFM úspěšně použita například pro přesné leptání chromu [35], výrobu nanoteček pomocí tekutého fotorezistu [36] nebo pro tisk proteinů [37]. Také byla využita k depozici měděných teček v atmosféře [38] a kapalině [39] v bezkontaktním módu AFM.

## 2.2 Dip-Pen (DPN)

Technika Dip-Pen je předchůdcem všech technik využívajících mikrofluidních sond AFM vyrobených technologiemi MEMS. Spočívá v tom, že se hrot AFM namočí do roztoku označovaného jako inkoust a přiblíží se k substrátu. V atmosférických podmínkách se mezi hrotem a substrátem vytváří vodní meniskus, který v tomto případě zprostředkuje difuzi molekul inkoustu na substrát a molekuly tvoří na povrchu substrátu novou vrstvu. Tuto techniku poprvé zmínili Manfred Jaschke a Hans-Jürgen Butt roku 1995 [40], kdy pozorovali depozici na zlatém substrátu den po jeho měření v roztoku oktadekanthiolu v ethanolu.



Obr. 2.3 Schéma techniky DPN [41]

Rozlišení tohoto způsobu nanolitografie závisí na mnoha parametrech. Ovlivňuje je například užitý roztok, materiál substrátu, skenovací rychlost či relativní okolní vlhkost [41]. Vlhkost má vliv na vypařování inkoustu a na velikost vodního menisku, a tedy na rychlost přenosu inkoustu na substrát. Rozlišení lze dále zlepšit využitím chemisorpce či samouspořádávání molekul po depozici pro dodatečné omezení difuze na substrátu [41]. Jako inkousty se používají organické molekuly, polymery, DNA, proteiny, peptidy, koloidní nanočástice, ionty kovů či koloidní suspenze, ale i tak je rozsah použitelných inkoustů značně

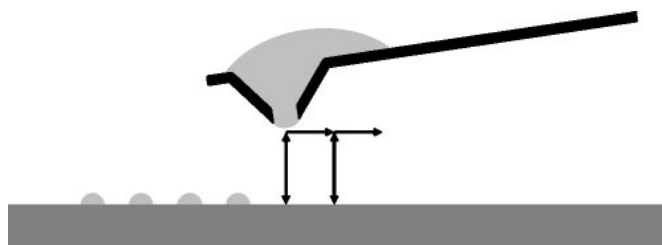
limitovaný. Substráty mohou být různé nevodivé, polovodičové nebo kovové povrchy [42]. Nejlepší dosažené rozlišení se pohybuje kolem 15 nm [43].

Oproti většině dalších nanolitografických technik nevyžaduje technika DPN přípravu rezistu nebo pasivační vrstvy na povrchu před samotným tiskem. Dále není nutné substrát ozařovat, jako například u fotolitografie či litografie elektronovým svazkem, ani vystavovat rozpouštědlům.

Nevýhodou této techniky je, že umožňuje tisk pouze jedné struktury najednou, a také že se nemůže používat pro tisk v kapalině. Kvůli zmíněnému pomalému tisku se tedy používá k výrobě prototypů, tvorbě masek nebo k úpravě struktur ze sériové výroby. Tuto nevýhodu lze částečně odstranit užíváním mnoha hrotů současně na jednom čipu i s různými inkousty [44]. DPN se díky své škále inkoustů dále používá například při vytváření souborů biomolekul pro zkoumání jejich vlastností: jako třeba schopnosti rozpoznávat další molekuly nebo při zkoumání samospořádávání materiálů. Zásoby roztoku naneseného na hrotu jsou malé a je nutné jeho vrstvu často obnovovat. To prodlužuje dobu celého tisku a nedostatek kontroly nad naneseným množstvím činí rozlišení nekonzistentním [42]. To podnítilo vývoj způsobů, jak tisknutou tekutinu k hrotu kontinuálně dopravovat.

### 2.3 Nanodispensing (NADIS)

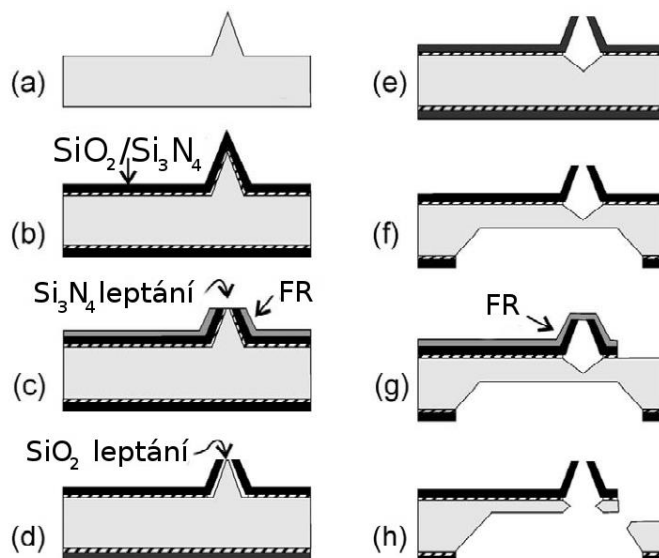
Nanodispensing neboli NADIS využívá dutého AFM hrotu a jeho vývoj byl inspirován výrobou hrotů pro SNOM [45]. Inkoust se do hrotu dodává pomocí mikropipety operované mikromanipulátory pod optickým mikroskopem. Nejčastěji se jedná o roztoky různých látek v glycerolu [46]. Kapilární síly zabraňují toku kapaliny, dokud nedojde k jejímu kontaktu s povrchem vzorku a vytvoření menisku. Hrot se tedy přivede do kontaktu s povrchem, jeho pohybem se inkoust nanese na požadovaná místa a oddálením hrotu se meniskus přeruší. Glycerol se po čase vypaří a zanechá na povrchu látku, která v něm byla rozpuštěna. Do rezervoáru v hrotu je nutné často kapalinu doplňovat, i když méně často, než je třeba namáčet hrot v případě DPN.



Obr. 2.4 Schéma operace NADIS [46]

Výroba prvních dutých hrotů NADIS vycházela z výroby standardních hrotů AFM. (viz 1.2 Sondy). Její průběh je schematicky zachycen na obrázku 2.5. Nejprve byl vyroben křemíkový hrot na křemíkovém *wafere* pomocí anizotropního podleptání kotoučové masky  $\text{SiO}_2$  v hydroxidu draselném (a). Termální oxidací a následnou depozicí  $\text{Si}_3\text{N}_4$  pomocí metody LPCVD (*Low pressure chemical vapour deposition*) se získá forma hrotu (b). Následné nanesení fotorezistu rezistu metodou *spin-coating* zajistí, že špička hrotu zůstane fotorezistem nepokryta, a plazmové leptání z ní odstraní nitrid křemičitý (c). Leptání odhalené špičky hrotu pomocí kyseliny fluorovodíkové odstraní vrstvu  $\text{SiO}_2$  pod nitridem v oblasti hrotu a odhalí křemíkový hrot (d), který je následně vyleptán pomocí KOH (e). Z druhé strany naproti hrotu se odleptá vrstva nitridu a oxidu křemičitého a určitá část samotného křemíku (f). Nakonec se celý hrot vyleptá z *wafere* (g) a zbylý křemík zakrývající dutinu hrotu je taktéž odleptán (h). Apertura hrotů vyrobených touto metodou dosahovala průměru kolem 1  $\mu\text{m}$ . Na vrchní straně

nosníku je zpravidla vyleptána tzv. loading zóna, kam se nanáší inkoust. Za účelem zamezení smáčení celého nosníku inkoustem se dno loading zóny vyleptá až na dolní vrstvu  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Nitrid křemíku je hydrofilní, zatímco okolí loading zóny je tvořené hydrofobním křemíkem, což zajistí snazší plnění hrotu.



Obr. 2.5 Schéma výroby NADIS. FR označuje vrstvu fotorezistu [45]

Za účelem výroby hrotů s ještě menší aperturou byla použita metoda FIB (Focused ion beam) [46]. Použit byl standardní hrot AFM, do něhož byla vyhloubena apertura pomocí zmíněného FIB. Vrchní část nosníku nad hrotem, která byla pokryta odrazivou vrstvou zlata, byla taktéž odstraněna užitím FIBu, aby byla vytvořena loading zóna s objemem v řádu stovek femtolitrů. Zlatá vrstva byla chemickou úpravou učiněna hydrofobní, aby nedocházelo ke smáčení nosníku. Apertura takto vyrobeného hrotu se pohybovala kolem 200 nm. Značnou nevýhodou této výroby je ale její kusová povaha a cena.

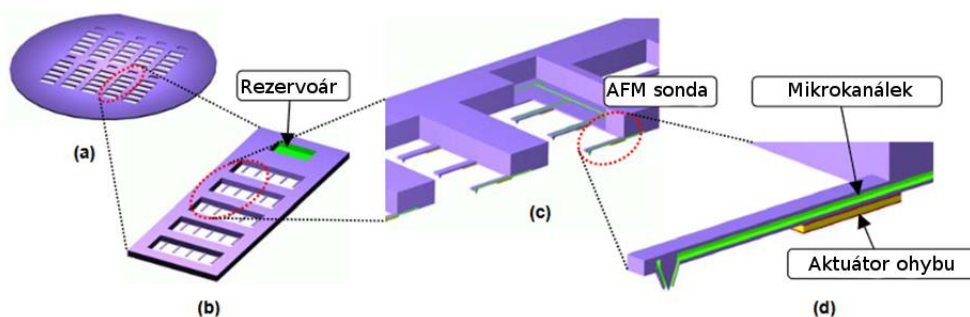
Rozlišení NADIS je především závislé na velikosti apertury hrotu. V případě velikosti apertury kolem 1  $\mu\text{m}$  se objem uvolněné kapky na povrchu pohyboval v řádu femtolitrů [45]. Při aperturách 200 nm byl její objem až v řádu attolitrů [46]. Dále depozici, a tedy rozlišení, ovlivňuje velikost vzniklého menisku při kontaktu hrotu se substrátem. Ten je určen geometrií hrotu, jeho materiálem a vlastnostmi povrchu a inkoustu. V nejlepším případě by byl nejmenší dosažitelný průměr nanesené kapky roven průměru apertury hrotu [46]. V rámci experimentů byly nanášeny kapky glycerolu obsahující 20nm polystyrenové nanočástice na hydrofobní a hydrofilní povrch [46]. Průměr nanesených kapek byl nejméně 720 nm pro hydrofilní a 370 nm pro hydrofobní povrch. To je mnohonásobně větší stopa než u DPN. Po odpaření glycerolu ale zůstaly na povrchu pouze zmíněné nanočástice o průměru 20 nm. V případě nanášení samotného glycerolu na hydrofobní povrch byla po jeho odpaření naměřena neodpařitelná rezidua o průměru 70 nm. Alternativně lze k depozici využít pulzy elektrického napětí mezi rezervoárem v hrotu a vodivým substrátem [47]. Tento způsob nevyžaduje kapilární síly a vodní meniskus a dochází při něm k depozici kapek o objemu v řádu zeptolitrů. Průměr kapek pak dosahuje rozměrů pod 100 nm – mnohem menších než apertura dutého hrotu.

NADIS dovoluje tisk široké škály materiálů. Za zmínku stojí tisk biomolekul, různých katalyzátorů, rezistů nebo suspenzí nanočástic [45]. Byl použit například pro lokální modifikaci micelární vrstvy [48]. Umožňuje ekonomické využití tisknutého materiálu a nevyžaduje mnoho příprav před samotným tiskem. Používá se tedy často jako doplněk ostatních nanolitografických

technik nebo například pro výrobu prototypů či tisk souborů biomolekul obdobně jako DPN. Jeho nevýhodou je otevřený rezervoár na inkoust, kusový charakter tisku, nemožnost tisku v kapalině a nutnost práce v prostředí s kontrolovanou vlhkostí (obzvláště při práci s hroty s malou aperturou) [45]. Pro zamezení předčasnému vypaření inkoustu z malého otevřeného rezervoáru v hrotu či substrátu se do inkoustu musí přidávat již zmiňovaný glycerol, což ještě více limituje rozsah použitelných inkoustů. Nevýhody kusového tisku, tedy že lze tisknout pouze jednu strukturu současně, je možné podobně jako u DPN částečně obejít použitím více hrotů současně na jednom čipu [46].

## 2.4 Fountain Pen Probe

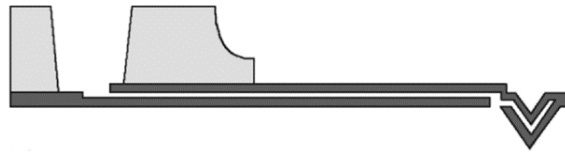
Další krok ve vývoji těchto přímých metod nanolitografie s sebou nesl výrobu mikrokanálek uvnitř samotného nosníku pro dopravu inkoustu z velkého rezervoáru v oblasti čipu k samotnému hrotu [49]. To mělo zcela eliminovat nutnost inkoust do hrotu doplňovat nebo v něm hrot často namáčet, a urychlit proces tisku. Velký rezervoár v oblasti samotného čipu by usnadnil dodávání tekutiny a spolu s uzavřenými kanálky by zmenšil význam vypařování inkoustu, a tedy odstranil nutnost přidávat do inkoustu glycerol jako v případě NADIS. Dále by integrace mikrokanálek do nosníků umožňovala vývoj masivně paralelních sond, kdy by jeden čip obsahoval několik rezervoárů poskytujících inkoust mnoha blokům *cantileverů* a kontakt každého hrotu se substrátem by byl ovládán ohybem jeho nosníku pomocí integrovaných piezoelektrických prvků [49].



Obr. 2.6 Schéma paralelních dutých cantileverů [49]

Fountain Pen Probe byl první plně funkční *cantilever* s integrovanými mikrokanálky [50]. Jeho výroba vychází z výroby standardních AFM hrotů. Rezervoár je v čipu vytvořen metodou *micropowder blasting*<sup>3</sup> [51] [52]. Mikrokanálky jsou vytvořeny vyleptáním vrstvy polykrystalického křemíku mezi dvěma vrstvami  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , jež tvoří samotný *cantilever*. Apertura je pak vytvořena fotolitograficky u paty hrotu, což zanechává hrot ostrý a použitelný pro následná přesná měření nanosených struktur. Nitrid křemičitý je hydrofilní a inkoust je tedy z rezervoáru díky kapilárnímu tlaku dopraven mikrokanálky k patě hrotu, odkud steče na špičku hrotu.

<sup>3</sup> mikroskopická verze pískování



Obr. 2.7 Schéma Fountain pen Probe [50]

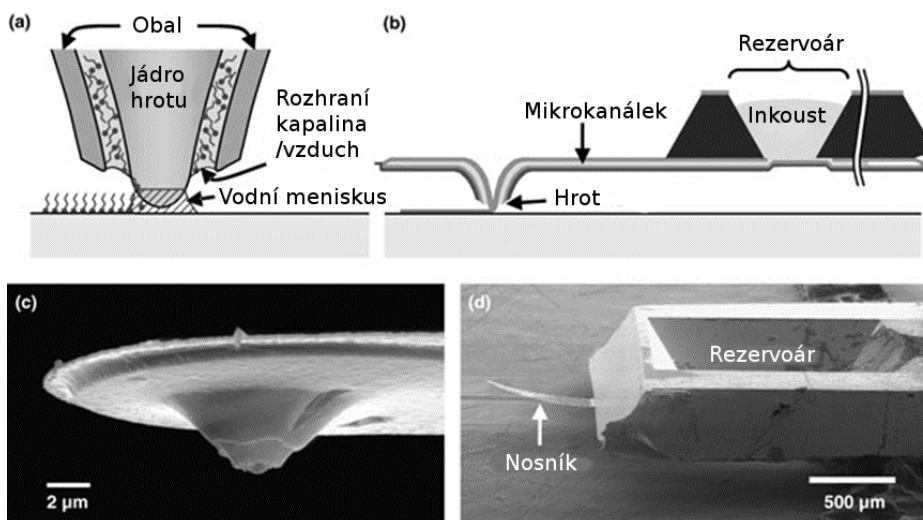
Před použitím byla sonda vypálena v peci na 280 °C, aby byly mikrokanálky zbaveny případných organických nečistot. Tuto proceduru bylo třeba časem opakovat. Zaplnění mikrokanálek bylo pozorováno změnou rezonanční frekvence *cantileveru*. Pozorované změny byly ale v důsledku rovnoměrně rozložené hmotnosti kapaliny v nosníku konzistentní, a tedy bylo možné oproti NADIS využít rezonanci k měření. Díky pozorované zvýšené adhezi hrotu za přítomnosti kapaliny v rezervoáru bylo potvrzeno, že dochází k toku inkoustu ke hrotu [50].

Rozlišení tisku pomocí Fountain Pen Probe se při provedených experimentech pohybovalo pod 1 μm, ale nedosahovalo rozlišení pod 100 nm. Způsobeno je to velkou aperturou, jež je vyrobena fotolitograficky, a nemožností regulovat tok inkoustu. To vede k dodávání většího množství inkoustu na hrot, což způsobí formování velké kapky, která smáčí hrot a substrát podobně jako v případě NADIS. Případná optimalizace geometrie hrotu, toku inkoustu a zvýšení jemnosti užitého substrátu může toto rozlišení zlepšit [50].

Fountain Pen Probe se tedy svými parametry a užitím podobá NADIS. Jeho výhodou je ale již zmíněná větší rychlost tisku díky mnohonásobně většímu rezervoáru, ostrý hrot a možnost užití větší škály inkoustů, kterou s sebou nese oprostění od nutnosti přimíchávat do nich glycerol. Stále ale využívá kapilárních sil a funguje pouze v atmosféře.

## 2.5 Nanofountain Pen (NFP)

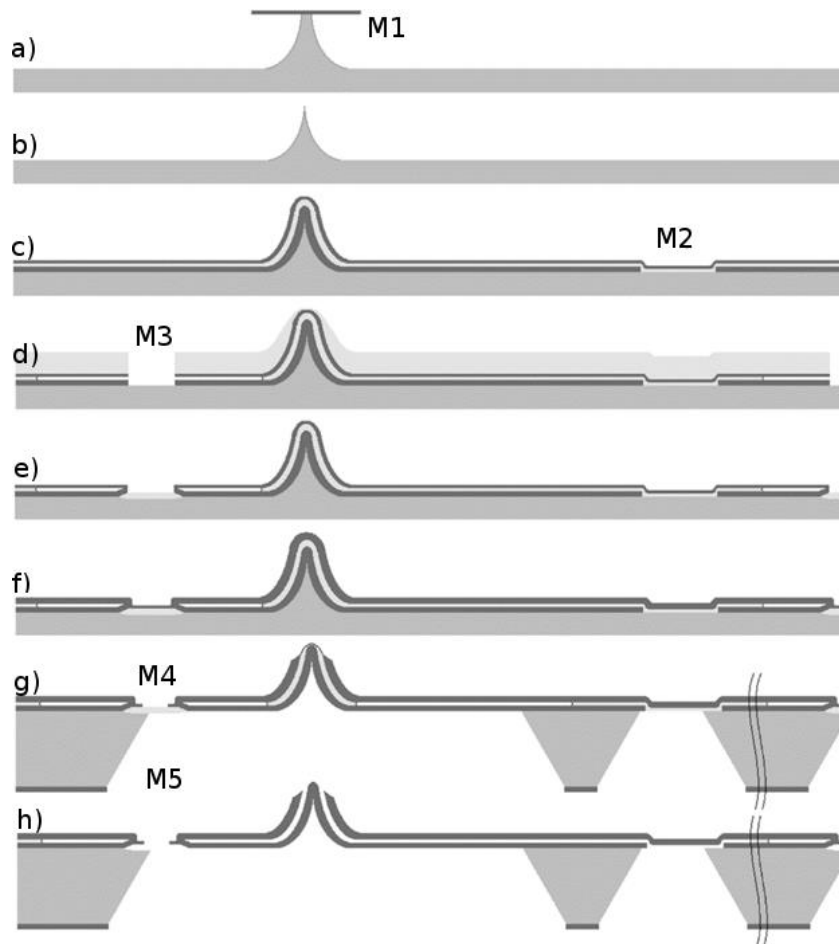
Nanofountain Pen využívá mikrokanálku v nosníku a velkého rezervoáru na inkoust v čipu podobně jako Fountain Pen Probe, ale navíc při tisku dosahuje lepšího rozlišení [53]. Vděčí za to složitěji definované apertuře, kterou se inkoust dostává z mikrokanálků na hrot. Samotný hrot je kuželovitý, mikrokanálek jej obklopuje a kruhová apertura se nachází až blízko samotné špičky hrotu. Takto se rozhraní inkoust-vzduch vytvoří v dostatečné blízkosti špičky, aby na ni byly naneseny molekuly inkoustu, ale přitom nedochází k smáčení celého hrotu v inkoustu. Díky tomu NFP tiskne v difuzním módu a dosahuje rozlišení podobného jako DPN.



Obr. 2.8 (a) Schéma hrotu (b) Schéma NFP (c) SEM snímek hrotu (d) SEM snímek NFP [53]



Proces výroby tohoto hrotu zvaného *Vulcano Tip* je značně komplikovaný. Ilustruje ho obrázek 2.9. Nejprve se utváří samotný hrot pomocí leptání křemíku za užití masky M1 a následného oxidačního ostření (část a, b). Dále se nadeponuje 0,25–0,3 μm tlustá vrstva Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> metodou LPCVD za užití masky M2, jež určuje místo napojení mikrokanálek na rezervoár. Následně je nanese 0,4–0,5 μm tlustá vrstva SiO<sub>2</sub>, která tvoří tzv. *sacrificial layer*<sup>4</sup> a opět vrstva nitridu křemičitého o tloušťce 0,3–0,5 μm ohraničující bmilimolárníhroudoucí mikrokanálky (část c). S pomocí masky M3 se litografií a následným plazmochemickým leptáním (reactive ion etching – RIE) CF<sub>4</sub> jsou vymezeny samotné mikrokanálky a kontrolovaně se z nich vyleptá oxid křemičitý (část d). Boční otevřené konce kanálek jsou uzavřeny pomocí lokální oxidace křemíku (LODOS) pod maskou M3. Narostlá vrstva oxidu nadzvedne okraj vrstvy nitridu (*bird's beak*) a depozicí další vrstvy Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se mikrokanálek uzavře (část e, f). Litografií s užitím masky M4 se do nadeponované uzavírající vrstvy nitridu křemíku vytyčí geometrie nosníku, a přitom je i odstraněna špička vrchní vrstvy nitridu na hrotu, protože vyčnívá z užitého fotorezistu naneseného metodou *spin-coating*. Dále se na zadní straně s pomocí masky M5, RIE leptání Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a KOH leptání křemíku vymezi hranice čipu a vytvoří rezervoár (část g). Po nanesení odrazivé vrstvičky zlata či chromu jsou nakonec vyleptány zbytky oxidu křemíku, což propojí zbytek mikrokanálek s Vulcano špičkou a rezervoárem a uvolní celou sondu (část h) [54].



Obr. 2.9 Schéma výroby NFP [54]

<sup>4</sup> Vrstva sloužící k podpoře vyráběné struktury. V závěru výroby se vyleptá.

Pomocí deionizované vody s fluorescenčním barvivem byla pod fluorescenčním mikroskopem úspěšně otestována funkčnost mikrokanálek [54]. Litografické schopnosti NFP sondy byly testovány nejprve pouhým nanesením roztoku ODT (oktadekanthiol) či MHA (merkaptohexadekanová kyselina) v ethanolu jako inkoustu na hrot podobně jako u DPN a následně také úspěšně s využitím samotných kanálek. Bylo pozorováno, že se inkoust v rezervoáru na čipu v průběhu 12 minut vypaří. Proto se rezervoár zakrýval plíškem z PDMS (polydimethylsiloxan), případně se nabízí možnost do něj zavést trubici z většího rezervoáru.

Nejlepší dosažené rozlišení bylo 40 nm při tisku milimolárního roztoku MHA v ethanolu na zlatý substrát [53] a stabilně se dařilo dosahovat rozlišení pod 100 nm. To dokazuje, že se podařilo dosáhnout zmíněného difuzního přenosu molekul přes vodní meniskus v blízkosti hrotu obdobně jako u DPN. S výhodou byl použit jako materiál hrotu nitrid křemičitý, jenž je hydrofilní, a tudíž docházelo k optimální distribuci inkoustu na hrot. Rozlišení ovlivňuje teplota, relativní vlhkost a vlastnosti inkoustu a substrátu. Vliv má také rychlost skenování a tvar hrotu [54].

Samotný hrot NFP má sice poloměr kolem 250 nm, ale dosahuje podobné kvality zobrazení topografie povrchu vzorku jako standardní sondy. To je pravděpodobně způsobeno tím, že s povrchem interagují výstupky na hrotu, které vznikly při RIE leptání. Navíc sonda dosahuje lepšího zobrazení laterálních sil kvůli menší torzní tuhosti. Díky těmto vlastnostem se může bez problémů použít i k následnému zobrazování tisknutých struktur [54].

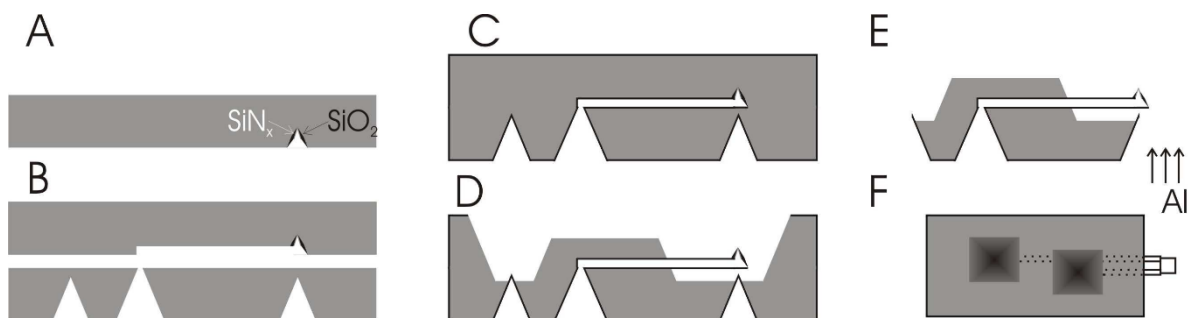
Technika NFP sond je využitelná k podobným aplikacím jako DPN a dále možnosti této techniky rozšiřuje [42]. Přinesla pokrok v depozici organických a neorganických molekul a jejich manipulaci. S pomocí NFP s integrovanými elektrodami bylo dosaženo depozice proteinových teček a čar [55] a sonda byla také například použita při vpichování nanodiamantů do buněk [56]. Experimenty jsou ale stále omezeny na atmosféru a výroba sond je značně komplikovaná.

## 2.6 NADIS druhé generace

Další vývoj techniky Nanodispensing (NADIS) vedl k implementaci mikrokanálek do *cantileveru* a rezervoáru na čip [57], jako tomu je u Fountain pen Probe a NFP. Výroba duté NADIS sondy druhé generace byla založena na spojení dvou upravených křemíkových waferů metodou *thermal fusion bonding*. Tento postup byl poprvé představen týmem Thomase Huga roku 2005 (viz Obr. 2.10) [58].

Jako materiál nosníku byl zvolen oxid křemíku, protože je hydrofilní, což umožňuje mnohem snazší tok tekutin mikrokanálky kapilárním efektem podobně jako při užití nitridu křemíku. Navíc je oxid průhledný, což případně umožňuje přímo pozorovat zaplňování kanálek.  $\text{Si}_3\text{N}_4$  je ale stále kvůli své vyšší pevnosti použit jako materiál hrotu. Navíc mohou být vrstvy nitridu oproti oxidu tenčí, což pomáhá nakonec dosáhnout vytvoření menší apertury na špičce hrotu při ostřelování fokusovaným iontovým svazkem. Základem výroby sondy byly dva 300  $\mu\text{m}$  široké a oboustranně vyleštěné křemíkové wafery, na které byla termální mokrou oxidací nanese vrstva  $\text{SiO}_2$  o tloušťce asi 300 nm. Do vrstvy oxidu vrchního waferu byla zespodu metodou RIE vymezena oblast hrotu, jež se následně leptala v KOH pro vznik jehlanovité dutiny (A). Do ní byla dále vytvořena vrstva  $\text{Si}_3\text{N}_4$  technikou LPCVD tlustá 200 nm pro vytvoření hrotu. Nakonec byla metodou DRIE vyleptána struktura fluidního systému a samotného *cantileveru*. Na spodním waferu byla vytvořena 150 nm tlustá vrstva nitridu křemíku a technikou RIE byla do vrstev nitridu a oxidu křemíku vymezena oblast čipu a rezervoár, které byly dále vyleptány pomocí KOH (B). Potom byly oba wafery očištěny, zarovnány, aby struktury navazovaly, a podstoupili *thermal fusion bonding* proces (C). Po spojení následovala termální mokrá oxidace vzniklé struktury (D) a poté selektivní KOH leptání vrchní strany (E), dokud nebyl *cantilever* zcela odhalený a jednotlivé čipy se mohly uvolnit. Nakonec byla na celý *cantilever* nanese vrstva hliníku. Ta zabránila jeho nabíjení při

vytváření apertury hrotu fokusovaným iontovým svazkem a zároveň sloužila jako odrazivá vrstvička pro laserový paprsek. Průměr apertury definované metodou FIB na špičce hrotu se pohyboval kolem 200 nm.



Obr. 2.10 Schéma výroby NADIS druhé generace [58]

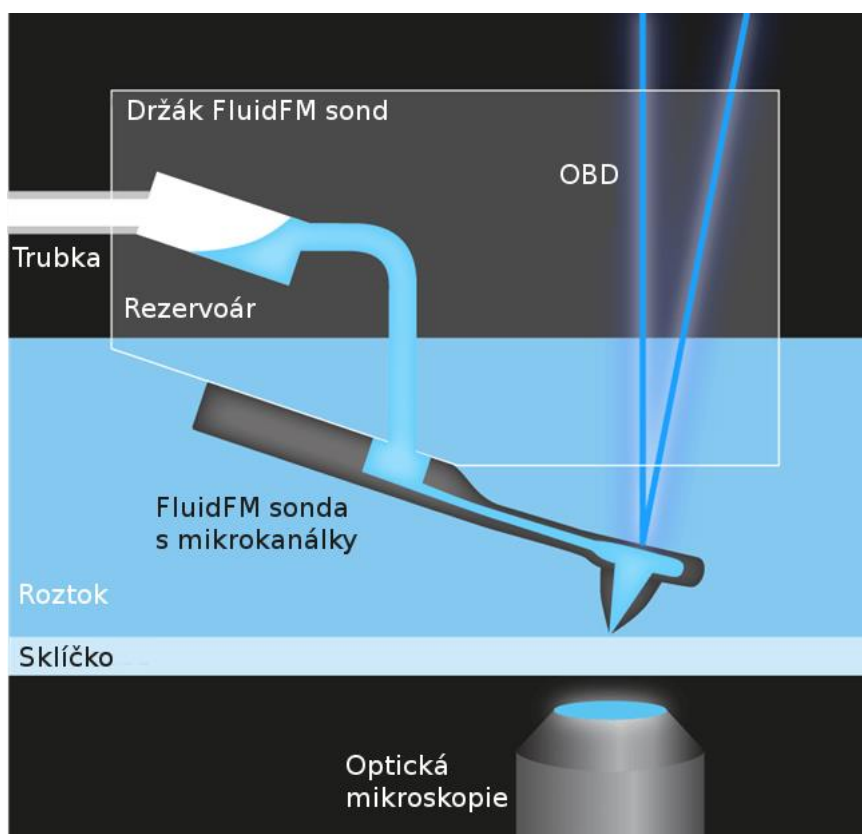
Kromě jednoduchých dutých nosníků byly vyrobeny i duté nosníky tvaru písmene U nebo soubor dutých cantileverů na jednom čipu se společnými či oddělenými rezervoáry [57].

Všechny dosud zmíněné duté sondy využívaly k přenosu tekutiny na povrch hlavně kapilárního efektu. To omezuje experimenty na atmosférické podmínky. S cílem umožnit pokusy v kapalném prostředí byla dutá sonda NADIS druhé generace upravena a otestována při práci v kapalině [59]. Čip byl nalepen na modifikovaný držák s kanálky, které spojovaly rezervoár na čipu s externí pumpou, jež umožňovala ovládat tlak kapaliny uvnitř sondy a tedy tok bez využití kapilárních sil. Vyroběným dutým *cantileverem* bez apertury s tuhostí kolem 10 N/m byla v kapalině v pokleповém módu změřena topografie živé buňky fibroblast. Depozice v kapalině byla demonstrována tiskem streptavidinových teček o průměru 3  $\mu\text{m}$  na biotinem funkcionalizovaný povrch skleněného sklíčka s pomocí sondy s aperturou 1  $\mu\text{m}$  a třísekundového tlakového pulsu o velikosti kolem 2 mbar (relativně k atmosférickému tlaku).

Tento vývoj rozšířil oblast užití dutých sond na kapalném prostředí, jež je přítomno v mnoha aplikacích v biologii či chemii. NADIS byl použit například pro vpichování fluorescenčního barviva do jednotlivých živých buněk [60].

### 3 FluidFM

*Fluidic force microscopy* neboli FluidFM je patentovaný a komerčně úspěšný systém kombinující AFM s mikrofluidikou a jedná se o zdaleka nejrozšířenější systém v této oblasti. Na začátku byla výzkumná skupina z ETH (Švýcarský federální technologický institut) v Zurichu pod vedením prof. Dr. Janose Vöröse a prof. Dr. Tomase Zambelliho, kde pracovali dva doktorandi Michael Gabi a Pascal Behr. V roce 2007 přišli s nápadem implementovat *force feedback* do mikropipet a učinit tak operace s nimi přesnější a šetrnější. Vyšli z AFM, ale na rozdíl od již zmíněného způsobu implementace nanopipety (viz Nanopipety v AFM) se rozhodli využít rozvíjejících se technologií výroby MEMS a vyrobit místo nanopipety dutou sondu. Za tímto účelem se spojili s výzkumnou skupinou kolem André Meistera, Ph.D. z CSEM SA (Švýcarské centrum pro elektroniku a mikrotechnologie) v Neuchâtelu, která se výrobou dutých sond zabývala. S ní se podíleli na vývoji NADIS druhé generace pro užití v kapalině (viz NADIS druhé generace). Systém FluidFM společně představili v publikaci roku 2009 [61] a po množství pozitivních ohlasů se ještě tentýž rok rozhodl Gabi spolu s Behrem založit kolem tohoto systému firmu Cytosurge.



Obr. 3.1 Schéma systému FluidFM [62]

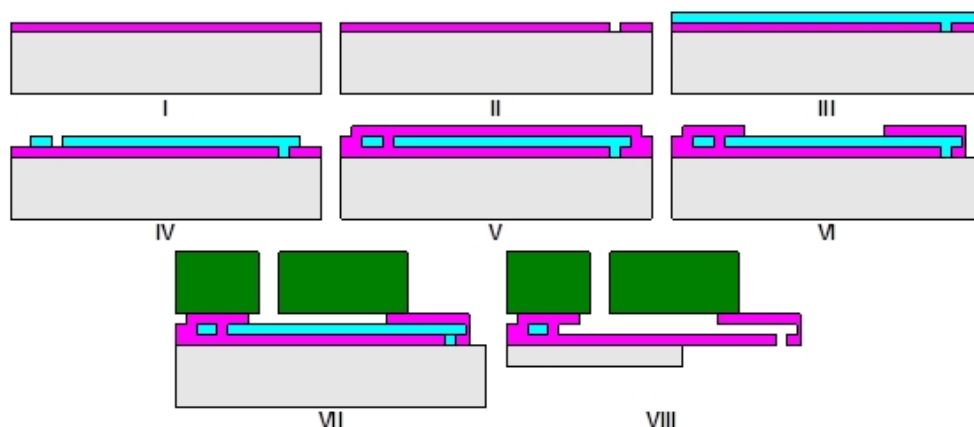
### 3.1 Vývoj prvního prototypu

Výrobě prvního prototypu systému FluidFM se detailně věnoval ve své dizertační práci [2] doktor Pascal Behr. V dalším textu budou shrnuty a doplněny její význačné výsledky.

#### 3.1.1 Výroba dutých sond

Duté sondy byly vyráběny dvěma metodami. Sondy vyrobené metodou A byly navrženy v úzké spolupráci s výzkumnou a vývojovou skupinou z CSEM SA, byla zcela totožná se způsobem výroby dutých NADIS sond druhé generace – dvouwaferový proces s užitím metody *thermal fusion bonding* (viz NADIS druhé generace).

Metoda B byla založena na užití metody *sacrificial layer*, podobně jako výroba Fountain Pen Probe a Nanofountain Pen (NFP) a byla vyvinuta ve spolupráci s firmami Cytosurge a SmartTip. Při tomto způsobu výroby jsou duté sondy vytvořeny z nitridu křemíku a její schéma je zachyceno na obr. 3.2. Pro vytvoření duté sondy bez hrotu je na křemíkový *wafer* nadeponována vrstva  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (I). Do ní je vytvořena apertura (II) a struktura je následně pokryta polykrystalickým křemíkem (III), který slouží jako *sacrificial layer*. V polykrystalickém křemíku jsou vytvořeny rýhy určující rozměry mikrofluidního kanálku v nosníku (IV). Dále je nanosená druhá vrstva nitridu křemíku a spolu s první jsou v nich vymezeny rozměry celého nosníku (V). Zároveň je ve vrchní vrstvě nitridu vytvořena apertura pro připojení k rezervoáru (VI). V závěru je vzniklý cantilever připojen pomocí tzv. *anodic bonding* k čipu z *waferu* ze skla Pyrex<sup>5</sup>, do kterého byl metodou *micropowder blasting* vytvořen vstup zarovnaný při spojení se vstupní aperturou nosníku pro připojení externího rezervoáru k čipu (VII). Nakonec je mokřím leptáním odstraněna vnitřní vrstva polykrystalického křemíku a postupně i podpůrný křemíkový *wafer* a do Pyrex skla jsou diamantovou řezačkou vyhloubeny drážky, podle kterých je sonda vylomena z *waferu* (VIII). Pro vytvoření duté sondy s hrotem s aperturou se navíc na začátku výroby do křemíkového *waferu* vytvoří jehlanovitá jamka pomocí mokřeho anizotropního leptání hydroxidem draselným. V její špičce se vytvoří *sacrificial layer* metodou tzv. rohové litografie [63]. Tato vrstva je využita jako maska při depozici další vrstvy a následně je odleptána. Vzniká tak první vrstva na podpůrném křemíkovém *waferu* s hrotem s aperturou, jejíž průměr může být až pouhých 80 nm [63]. Pak proces pokračuje nanesením polykrystalického křemíku, jak je již popsáno výše.



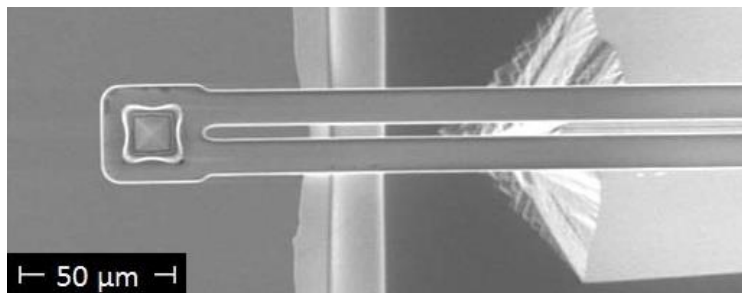
Obr. 3.2 Výroba [2]

<sup>5</sup> značka borokřemičitého skla

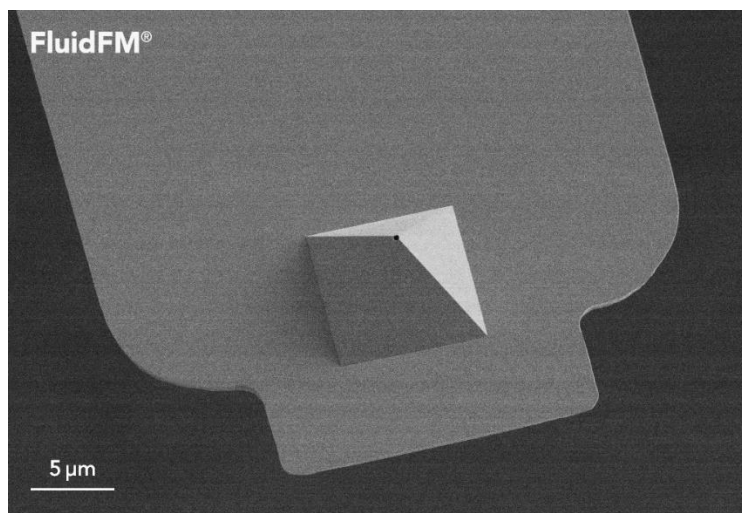


Obr. 3.3 Rohová litografie.  $\alpha$  je vrcholový úhel jamky,  $a$  tloušťka sacrificial layer,  $b$  tloušťka zbytkové sacrificial layer po odleptání [63]

Z počátku se používaly sondy vyrobené metodou A. Jejich výroba byla zvládnutá a vytváření apertury hrotu frézováním fokusovaným iontovým svazkem poskytovalo určitou volnost v její volbě. Pro hromadnou výrobu bylo ale užití FIB neefektivní a s rozvojem metody B se od metody A upustilo [64]. Sondy vyrobené metodou B jsou vhodné pro hromadnou výrobu, protože apertura v nich je vytvořená rovnou, bez nutnosti ji dodatečně vytvářet. Metoda umožňuje výrobu dutých sond bez hrotů, s dutým hrotem s aperturou na špičce či na boku hrotu. Navíc může být touto metodou vyroben i dutý hrot bez apertury a ta může být později vytvořena libovolně technikou FIB, což lze využít například u prototypů. K dnešnímu dni jsou duté sondy z nitridu křemíku (tj. vyrobené metodou zde označenou jako metoda B) standardem v systémech FluidFM.



Obr. 3.4 Sonda typu A [2]



Obr. 3.5 Sonda typu B [65]

Tuhost dutého nosníku lze analyticky spočítat podobně jako u nosníku plného z rovnice (2). Na dutou sondu působí jiný ohybový moment setrvačnosti kvůli jejímu odlišnému průřezu. Tento moment  $I_h$  se spočítá jako [17]

$$I_h = \frac{wt^3}{12} - \frac{w_h t_h^3}{12}, \quad (6)$$

kde  $w$  je šířka a  $t$  je tloušťka nosníku a  $w_h$  je šířka a  $t_h$  je tloušťka soustředné dutiny v nosníku. Dosazením do rovnice (2) lze získat tuhost dutého cantileveru  $k_h$  ve tvaru

$$k_h = \frac{E}{4L^3} (wt^3 - w_h t_h^3), \quad (7)$$

Analytický výpočet tuhosti je oproti tuhosti skutečné vzhledem k nepřesnostem výroby a tím i skutečných rozměrů zatížený značnou chybou. Pro měření tuhosti dutých sond lze stále použít Saderovu metodou zmíněnou v kapitole o AFM [66]. Při zaplnění mikrokanálku tekutinou se sníží rezonanční frekvence cantileveru, ale jeho schopnost měřit topografii není zásadně ovlivněna. Tuhost a činitel jakosti se nezmění.

V práci byla také zkoumána a testována i výroba dutých sond celých z polymeru SU-8 bez hrotu. Byly provedeny numerické simulace a otestovány tři strategie výroby – výroba s užitím adhezního spojení, zanořené kovové masky a nakonec laminace. Žádná z nich se neprokázala jako úplně vhodná pro případnou budoucí hromadnou výrobu. Metoda uspokojující tyto požadavky byla představena v pozdější práci [67]. Dále byly navrženy duté SU-8 sondy s hrotem s aperturou [68] [69] či s integrovanými stříbrnými nanodráty jako piezoresistivními senzory ohybu [70]. Průměr apertur hrotů se pohyboval kolem 10  $\mu\text{m}$  s potenciálem dosáhnout rozměrů pod 1  $\mu\text{m}$ . Byl představen i 3D tisk dutých sond z polymerů [71], ale plnohodnotné náhrady dutých sond založených na křemíku sondami z polymerů nebylo zatím dosaženo.

### 3.1.2 Výroba držáku dutých sond

Pro integraci dutých sond do AFM bylo zapotřebí vyvinout vhodný držák. Držák měl obsahovat kanálky pro propojení duté sondy s externím rezervoárem a toto spojení muselo být těsné. Byla nutná mechanická stabilita pro zamezení posuvu i při aplikaci tlaku na mikrofluidní systém. Dále bylo potřeba, aby byl držák kompatibilní s AFM zařízením a nezasahoval do dráhy laserového paprsku. Dutá sonda měla být ideálně nerozebíratelně spojena s držákem a používat se jako celek za účelem usnadnění manipulace a zamezení kontaminaci. Pro účely měření proudů iontů bylo nutné eliminovat přítomnost unikajících proudů a parazitních kapacit v držáku.

Postupně byly vyvinuty čtyři návrhy držáků dutých sond. Poslední návrh nazvaný CytoClip (viz obr. 3.5) vyvinutý ve spolupráci s Cytosurge uspokojivě splňoval všechny zmíněné požadavky. Vyroběn je z polymethylmethakrylátu neboli pexiskla a funguje jako mechanická svorka, která se připevní na upravený AFM držák. Držák dutých sond je spojen se sondou pojídlem založeným na epoxidové pryskyřici. To eliminuje nutnost používat na toto spojení speciální o-kroužek jako u předešlých designů, na němž se formovaly nechtěné vzduchové bublinky, které následně negativně narušovaly průběh experimentů. CytoClip obsahuje integrovaný rezervoár schopný pojmout až 50  $\mu\text{l}$  tekutiny. Zezadu je výstup z rezervoáru napojen na plastový konektor s o-kroužkem, do kterého je zavedena hadička z externího rezervoáru s kontrolou tlaku.



Obr. 3.6 Držák CytoClip [2]

### 3.1.3 Ovládání mikrofluidního toku

Způsob řízení toku představují například elektroosmotické pumpy [72], evaporační pumpy [73], či *syringe* pumpy [74] (viz Femtopipeta). Elektroosmotické pumpy potřebují integraci elektrod a nedosahují vyšších tlaků, evaporační pumpy vyžadují komplexní integraci do duté sondy a mají omezený rozsah použití a *syringe* pumpy způsobují tlakové pulzy v toku a mají dlouhé reakční a ustalující časy. Z těchto důvodů byl pro ovládání toku po zvážení všech možností použit hlavně aktivní regulátor tlaku, případně hydrostatická pumpy. Později se z důvodu automatizace používal už jen aktivní regulátor tlaku.

Tento regulátor byl inspirovaný konfigurací elektronického Wheatstonova můstku a skládal se z aktivní tlakové pumpy v kombinaci s komplexní sítí tlakových a pojišťovacích ventilů. Zpočátku byl používán systém od firmy Fluigent SA. Finální systém regulace tlaku uzpůsobený potřebám FluidFM dodala firma Cytosurge. Skládá se ze dvou skříní. První tvoří kontrolér a druhá obsahuje pumpy a rezervoáry a může být umístěna dále od experimentální sestavy pro omezení rušení. Skříně jsou spojeny pneumaticko-elektrickým kabelem. Systém umožňuje vytvářet kladný i záporný tlak relativní tlak vůči tlaku atmosférickému, má rychlou odezvu a ustálení, při změnách nevytváří pulzy v toku, může pracovat s libovolnou kapalinou a je snadno začlenitelný do FluidFM systému. Poskytuje rozsah relativních tlaků od -800 mbar do +1000 mbar s rozlišením 0,78 mbar pro záporné a 0,98 mbar pro kladné relativní tlaky.



Obr. 3.7 Skříně regulátoru tlaku. Vlevo kontrolér. Vpravo komora s pumpami. [2]

Stanovení přesného průtoku z použitého tlaku je komplikované, protože vyžaduje znalost přesného pneumatického odporu mikrofluidního systému. Tok sondou je odhadován i na femtolitry za sekundu, což znemožňuje jeho přímé měření průtokoměry s dobrou přesností. Přibližnou závislost toku na aplikovaném tlaku lze stanovit analyticky nebo simulovat numericky [66].



### 3.1.4 Ovládání posuvu vzorku a software

AFM sestava již disponuje ovládním posuvu vzorku. Rozsah jemného pohybu integrovaných motorků využívající piezoelektrického jevu v ose kolmé na povrch vzorku (osa z) je zpravidla nedostačující pro silovou spektroskopii u jednotlivých buněk. Byl tedy vyvinut oddělený adaptér s vlastními piezokeramickými prvky pro ovládání posuvu vzorku a rozšíření jeho rozsahu hlavně v ose z. Adaptér se nasadí na AFM sestavu a jeho pohyby je třeba synchronizovat s integrovanými piezoaktuátory v AFM [75].

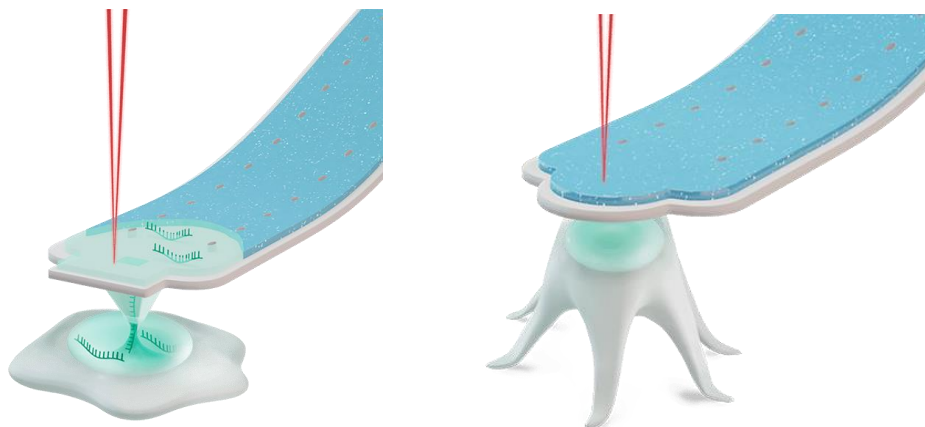
Nejprve byly všechny části FluidFM systému ovládány samostatně – AFM, optický mikroskop, ovládání tlaku, adaptér pro posun vzorku a dodatečné signály například ze zesilovačů při měření iontových proudů. Později byl ve spolupráci s Cytosurge vyvinut integrovaný software CyUI ovladatelný přes pokročilé dotykové rozhraní, který integruje ovládání všech zmíněných prvků do jednoho uživatelského prostředí, což významně zjednodušuje a urychluje měření.

### 3.2 Aplikace

Systém FluidFM umožňuje dodávat na povrch či do buněk prakticky libovolnou tekutinu až v objemu femtolitrů [2] nebo pod tlakem tekutinu nasávat, a to vše s vysokou prostorovou přesností a citlivou silovou odezvou. To poskytuje širokou oblast užití tohoto systému, kde tou hlavní je oblast mikrobiologie.

Systém byl použit například k depozici nanočástic [76] [77], nanotisku [78], kontrolovanému uspořádání molekul [79] [80] [81], stimulaci neuronů [82] nebo vytváření struktur v hydrogelu [83]. Důležité je zbavit tekutinu částic větších, než je apertura hrotu a zaplňovat mikrokanálky kapalinou pomocí přetlaku za atmosférických podmínek, což usnadňuje vytlačování plynu a zabraňuje nechtěnému formování jeho bublin v mikrokanálkách. Vzhledem k povrchovému napětí kapaliny ve vzduchu nelze kapalinu dávkovat hrotem s aperturou menší než 1  $\mu\text{m}$  za atmosférických podmínek [2], jelikož tlak k tomu potřebný by dříve zničil dutou sondu. Toto není problém při dávkování kapaliny v kapalném prostředí. Rozlišení tisku ve vzduchu je tedy kolem 1  $\mu\text{m}$ , kdežto v kapalině až 300 nm [84].

FluidFM se dále používá pro injekci či extrakci (při podtlaku) látek z jednotlivých buněk [85] [86] [87] [88] [89]. Za tímto účelem se používají duté hroty s aperturou na boční stěně hrotu blízko špičky, aby mohl hrot proniknout membránou buňky. Průnik je pozorovatelný na F-d křivce [61]. Nicméně i duté hroty s aperturou na špičce lze přivést do kontaktu s membránou a přenést přes ni určité látky do buňky difuzí [90]. Dále lze charakterizovat lokální mechanické vlastnosti buněk podobně jako s normálním AFM hrotem [91].



Obr. 3.8 Schéma operace FluidFM. Vlevo injekce do buňky. Vpravo měření adheze. [92] [93]

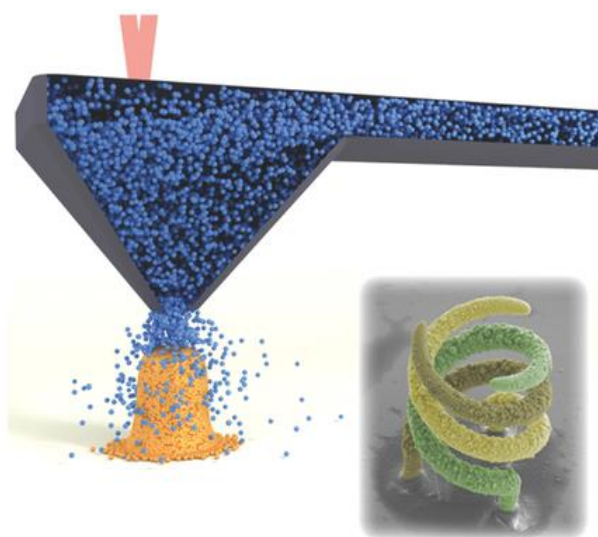
Pomocí vytvoření relativního podtlaku v sondě vůči atmosféře lze při přiblížení sondy k buňce buňku přisát, oddálením sondy ji zvednout a následně může být buňka přemístěna [94]. Pro tyto experimenty se používají duté sondy bez hrotů. FluidFM tedy může být použito pro vytváření struktur z jednotlivých buněk [95]. Dále lze měřit adhezní síly působící při oddělování buněk eukaryotních [96] [97] [98] [99] či mikrobiálních [96] [100] [101] [102] [103]. Navíc lze dutou sondou nasát malou kuličku a použít ji jako vyměnitelný sférický AFM hrot [66] pro zkoumání mechanických vlastností celých buněk [104]. V případě, že je zapotřebí pracovat s malým množstvím vzácného roztoku, lze sondu naplnit tzv. *dummy* roztokem pro vyplnění mikrokanálek a malé množství kapaliny nasát přímo hrotem [105].

Tyto aplikace technika FluidFM zároveň doplňuje schopností zobrazovat topografii podobně jako AFM. Tvrdé vzorky lze zobrazovat v kontaktním módu, ale vzhledem k vyšší tuhosti většiny vyrobených dutých sond (>1 N/m) došlo při měření živé buňky k jejímu smetení na stranu skenování samotného hrotu [59]. I minimální *deflection setpoint* vede kvůli vysoké tuhosti k velkým kontaktním silám. Obejít tento nedostatek lze měřením v pokleповém režimu, kdy se tuhost cantileveru změní na tuhost efektivní  $k_{ef}$  [2], pro kterou platí vztah

$$k_{ef} = \frac{k}{Q}, \quad (8)$$

kde  $k$  je původní tuhost a  $Q$  je činitel jakosti. Měření topografie dutým hrotem s aperturou na samotné špičce vede k výskytu významných konvolučních efektů a vzniku tzv. *ghost* obrazů. Vliv tlaku v mikrokanálcích na odezvu v ose  $z$  je pozorovatelná pouze při změně směru toku a měření samotné významně neovlivňuje [2].

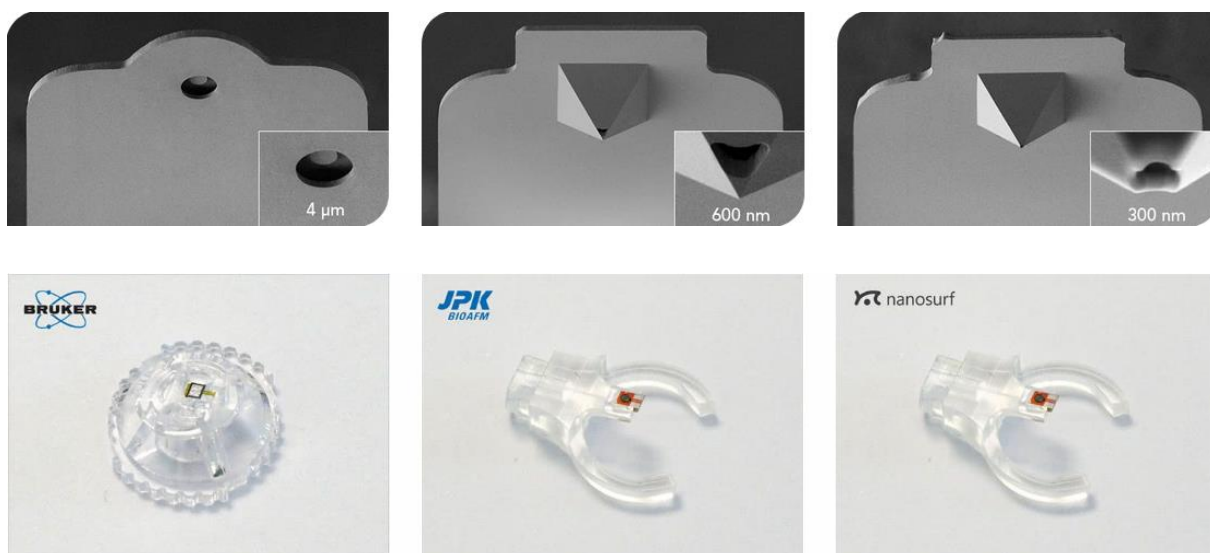
Užití FluidFM lze dále rozšířit implementací elektrod pro vyvolávání a zaznamenávání iontových proudů skrze aperturu hrotu a využít je k bezkontaktnímu měření topografie (SICM) [106], zaznamenávání aktivit biomolekul [107] či studování iontových proudů v buňkách (*patch clamp*) [108]. V jednom měření lze poté získat například informace o topografii a mechanické a elektrické vlastnosti vzorku. Implementace elektrod do FluidFM navíc otevřela novou oblast nanotisku kovových 3D struktur pomocí elektrochemické depozice kovových iontů [109] [110] [111] [112] a to vedlo roku 2019 až ke vzniku nezávislého *spin-offu* firmy Cytosurge – firmy Exaddon, která se zaměřuje na výrobu kovových mikrostruktur právě touto technikou. Rozlišení tisku touto technikou je v řádu mikrometrů [113].



Obr. 3.9 3D nanotisk elektrochemickou depozicí [110]

### 3.3 Produkty

Cytosurge nabízí tři typy dutých sond. Vyrobeny jsou z nitridu křemíku, rozměry mají 200 x 36 x 1,7  $\mu\text{m}$  (délka x šířka x výška) a jsou pokryty 40nm odrazivou vrstvou chromu či zlata. Případné jehlanovité hroty mají rozměry 10 x 10 x 7  $\mu\text{m}$ . FluidFM Micropipette je sonda bez hrotu a nabízí se s aperturou o průměru 2  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ . Na výběr jsou se jmenovitou tuhostí 0,3 N/m, 1 N/m, 2 N/m a 4 N/m s příslušnými výškami mikrofluidních kanálků (po řadě) 500 nm, 500 nm, 1000 nm a 1500 nm. Dále se prodává sonda FluidFM Nanopipette, jež má hrot s aperturou o průměru přibližně 300 nm na špičce. Prodávané tuhosti jsou 0,6 N/m a 2 N/m s příslušnými výškami kanálků 500 nm a 1000 nm. Poslední z nabízených dutých sond je FluidFM Nanosyringe. Tato varianta má aperturu na boční straně hrotu. Nominální průměr apertury je 600 nm, ale kus od kusu se pohybuje v rozmezí 300-800 nm. Nabízená tuhost je 2,2 N/m s výškou mikrokanálku 1500 nm. Cytosurge spolupracuje s výrobcí AFM sestav Nanosurf, Bruker a JPK a sondy se prodávají s držáky uzpůsobeny systému FluidFM ADD-ON pro jejich sestavy, případně systému FluidFM OMNIUM (viz dále). K těmto sondám navíc prodává FluidFM pneumatický konektor pro připojení k FluidFM mikrofluidnímu kontrolnímu systému. Jednotlivé sondy nebo pneumatický konektor stojí přibližně 180 € (k roku 2022).



Obr. 3.10 SEM snímky nabízených dutých sond (nahore) a držáky pro příslušné výrobce (dole). Snímky SEM (zleva): Mikropipette, Nanosyringe, Nanopipette [114]

Firma Cytosurge nabízí samostatný vysoce automatizovaný systém FluidFM systém zvaný FluidFM OMNIUM (dříve nazývaný FluidFM BOT). Obsahuje integrovaný optický mikroskop, *force-control* jednotku a inkubátor s regulovatelnou teplotou a obsahem  $\text{CO}_2$ . Většina akcí je plně automatizována a efektivně ovládána přes intuitivní uživatelské rozhraní. Systém má aplikace ve vývoji řad buněk metodou CRISPR<sup>6</sup> nanotisku, virologii, neurovědě či mechanobiologii. Cena systému se pohybuje přibližně od 300 tisíc Euro do 400 tisíc Euro (k roku 2022).

<sup>6</sup> technika genetického inženýrství



Obr. 3.11 FluidFM OMNIUM [115]

Dalším produktem je FluidFM ADD-ON. Je to adaptér, který přemění regulární AFM sestavu na FluidFM systém. Kompatibilita je zaručena s modely AFM od již zmíněných výrobců Nanosurf, Bruker a JPK. Vždy se jedná o malé AFM sestavy, které lze vložit do FluidFM ADD-ON (viz obr. 3.12). Dodává se s rozšiřujícím softwarem pro software používané AFM sestavy a míra automatizace závisí na daném AFM systému. Případný inkubátor pro řízení kontrolu teploty a koncentrace CO<sub>2</sub> je nutné dokoupit od výrobce daného AFM. Rozdíly v použití oproti FluidFM OMNIUM zachycuje tabulka níže. Cena systému se pohybuje přibližně od 30 tisíc Euro do 60 tisíc Euro.

V neposlední řadě nabízí Cytosurge službu komplexních úprav řad buněk užitím CRISPR speciálně vhodnou pro úpravu vzácných či těžko transfektovatelných<sup>7</sup> buněk.



Obr. 3.12 FluidFM ADD-ON [116]

<sup>7</sup> transfekce = proces dodávání nukleových kyselin do eukaryotických buněk

Tab. Srovnání FluidFM ADD-ON a FluidFM OMNIUM adaptováno z [117]

	FluidFM ADD-ON	FluidFM OMNIUM
<b>Nanotisk</b>		
Tisk nanostruktur	+++	++
Tisk souborů struktur	++	+++
Tisk in situ	++	+++
Tisk rozlehlých vzorů	-	+++
Tisk vzácných vzorků	+++	+++
<b>Virologie</b>		
Injekce/aplikace virionů	+	+++
Transfekce/editace genomů buněk pro výzkum virů	+	+++
Izolace buněk	-	+++
Spolukultivace s dalšími typy buněk /vytváření vzorů na buňkách	-	+++
Analýza/omika <sup>8</sup> jednotlivých buněk	+	+
<b>Neurověda</b>		
Vytváření vzorů na neuronálních buňkách	-	+++
Injekce/aplikace léčiv (stimulace)	+	+++
Transfekce/editace genomů neuronů	+	+++
Analýza/omika jednotlivých neuronů	+	+
Elektrostimulace	+*	-
Spolukultivace s dalšími typy buněk	-	+++
<b>Mechanobiologie</b>		
Měření adheze savčích buněk	++	+++
Měření elasticity či promáčknutí savčích buněk	+++	++
Měření adheze větších mikrobů	+++	++
Měření adheze bakterií	+++	-
Koloidní spektroskopie	+++	++
Vývoji řad buněk užitím CRISPR	Pouze FluidFM OMNIUM	

\*v kombinaci s elektrodami

Vysvětlivky: - nedoporučeno; + funguje s nedostatky; ++ funguje, ale ne vždy optimálně;  
+++ nejlepší volba

<sup>8</sup> omika – různé disciplíny biologie, jejichž názvy končí na -omika (genomika, proteomika, ...)

Firma Exaddon nabízí samostatný systém CERES Print System určený k tisku komplexních kovových struktur s rozlišením i pod jeden mikrometr. Systém kombinuje přesné polohování, tlakem řízené dávkování kapaliny, elektrochemickou depozici a optický *force feedback*. Intuitivní ovládání celé sestavy zajišťuje software CAPA. Použití systém nachází v opravě poruch a modifikaci povrchů polovodičů, výrobě vysokofrekvenčních mikroelektronických komponent a neuroprostatiky, modifikaci MEMS zařízení, mikrosenzorů a *lab-on-a-chip* komponentů, výrobě mikrocívek a spirál nebo třeba malých designových předmětů pro hodinky či šperky. Cena tohoto systému začíná na 300 tisících Euro (k roku 2022).



Obr 3.12 CERES Print Systém [118]

### 3.4 Další duté sondy

Od vydání první publikace o FluidFM [61] byly jinými výzkumnými skupinami představeny další duté sondy. Za zmínku stojí Femtopipeta a BioProbe.

#### 3.4.1 Femtopipeta

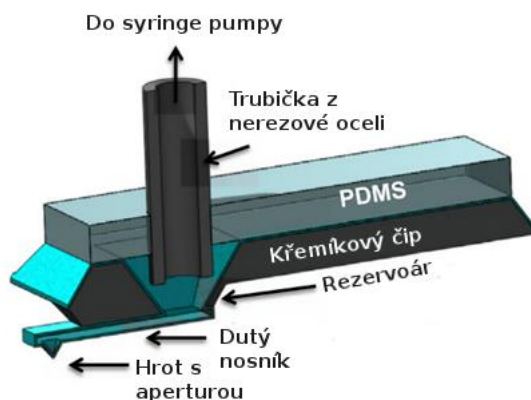
Femtopipeta byla vyvinuta za účelem umožnit nejenom dávkování tekutiny, ale i její nasávání. Využití zpětného toku dutou sondou do té doby žádná publikace neprezentovala. Po experimentech s vytvářením relativního přetlaku vůči tlaku atmosférickému pomocí zahřátí [119] byla představena dutá sonda se *syringe* pumpou [74]. Založena byla na výrobní metodě shodné s metodou A výroby FluidFM sond. Apertura byla vytvořena v blízkosti hrotu metodou FIB a měla průměr kolem 2  $\mu\text{m}$ . Bylo vyrobeno víko na rezervoár duté sondy z dvou vrstev polydimethylsiloxanu (PDMS) technikou mikromolding, do něž byla zavedena 9 mm dlouhá nerezová ocelová trubička s vnitřním průměrem 100  $\mu\text{m}$ , která byla připojena k Tygon<sup>9</sup> trubce vedoucí do samotné pumpy. PDMS sám o sobě má malou adhezi a byl tedy vystaven kyslíkové plasmě, což vedlo k jejímu zvýšení a víko lépe těsnilo. Těsnost víka byla úspěšně ověřena – tekutina v rezervoáru zůstala po 40 hodin oproti původním 18 minutám za situace bez víka

---

<sup>9</sup> značka pružných polymerních trubek

[119]. Problém odpařování tekutiny z rezervoáru je prakticky tedy zcela odstraněn jako u FluidFM.

Po spuštění pumpy se s drobným zpožděním kvůli hydrodynamickému odporu prázdné sondy zaplnily mikrokanálky deionizovanou vodou a byla pozorována změna rezonanční frekvence [74]. Na hrotu byla vytvořena velká kapka, jež byla následně po změně směru toku na syringe pumpě nasáta zpět. Bylo tedy potvrzeno, že lze takto vyrobené duté sondy používat jako pipety – femtopipety.



Obr. 3.13 Schéma Femtopipety [74]

V rámci dalšího vývoje byla vyrobena celá sestava pro depozici a extrakci tekutin pomocí femtopipet [120]. Požadavkem byla schopnost kontrolovat přenesený objem, který závisí na mnoha faktorech, jako například viskozitě kapaliny, relativní vlhkosti okolí či materiálu hrotu a povrchu. Sestava se skládala z AFM mikroskopu s klimatickou komorou pro kontrolu vlhkosti a teploty v okolí vzorku. Na 3D tiskárně na polymery bylo vyrobeno nové víko pro zakrytí rezervoáru, které bylo speciálním postupem přilepeno k duté sondě a spoj tak vydržel tlak větší než 5 barů. Syringe pumpa byla nahrazena systémem konstantního tlaku, jenž umožňoval měnit tlak od -0,8 barů do 5,0 barů s rozlišením 0,1 baru. S dutou sondou s aperturou 750 nm byla dosažena minimální kontrolovatelná rychlost toku tekutiny 50 fl/s. Pro zjednodušení celého procesu depozice byla pod substrát integrována mřížka s čtverci o straně 100  $\mu\text{m}$ , podle které se řídil vyvinutý systém, jenž automaticky hrot přesunul do oblasti zvoleného čtverce a provedl depozici na definovaných místech.

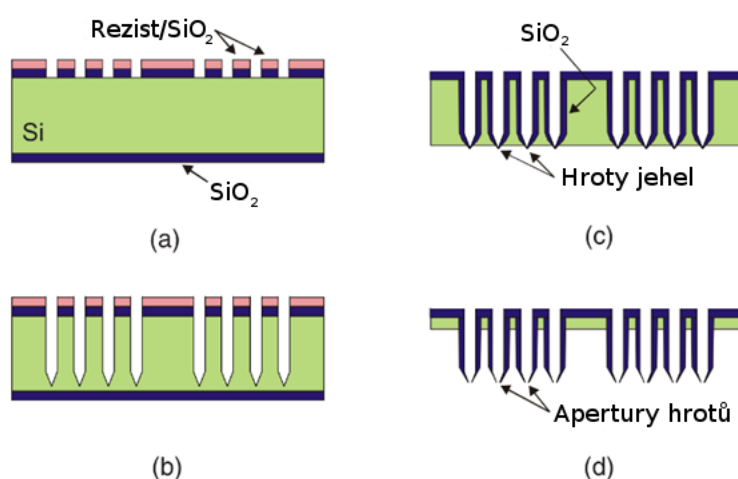
Femtopipeta tedy umožňuje práci v kapalině, kontrolovat do jisté míry přenesený objem a určitou úroveň automatizace depozice. S jejím využitím byla například provedena lokální syntéza a depozice zlatých nanočástic [121] nebo byly integrovány do robotických manipulátorů [122].

### 3.4.2 BioProbe

BioProbe je dutá sonda vyvinutá se zaměřením na mikrobiologii za účelem nahradit mikropipety při experimentech s buňkami podobně jako FluidFM. Charakteristickou je pro ni velice dlouhý tenký dutý hrot zvaný mikro či nanojehla, která je propojena mikrokanálky v nosníku se vstupem, jenž vede do rezervoáru umístěném na čipu. K rezervoáru může být připojen externí zdroj tlaku pro dávkování tekutiny [123].

Většina prvních mikrojehel vyráběných technologií MEMS byla navržena jako náhrada injekčních jehel pro snížení poškození tkání a bolesti při vpichu [124]. Jejich větší vnitřní průměr v desítkách mikrometrů zajistil dostatečnou tuhost pro průnik kůží, ale pro nahrazení mikropipet při jednobuněčných experimentech byly příliš velké. To vedlo k vývoji metody,

kteřá by umožňovala vyrábět mikrojechly s menším průměrem (viz obr. 3.14) [125] [126]. Použit k tomu byl oboustranně vyleštěný křemíkový *wafer*. Ten se pomocí mokré oxidace pokryl z obou stran vrstvou  $\text{SiO}_2$ , do niž byly fotolitografií a následným RIE vytvořeny z vrchní strany kruhové díry (část a). Skrze tyto otvory byly do křemíku vytvořeny postupně se zužující jámy pomocí tzv. *deep reactive ion etching* (DRIE)(část b). Poté následovala mokrá oxidace pro pokrytí povrchu uvnitř děr vrstvou oxidu křemíku. Ze spodní strany waferu je odstraněna vrstva  $\text{SiO}_2$  a odleptán křemík užitím  $\text{XeF}_2$ , dokud se neodhalí oxidové špičky hrotů. Ty jsou poté odstraněny RIE procesem a vytvářejí aperturu jednotlivých jehel (část c). Samotné jehly jsou odhaleny dalším leptáním křemíku (část d). Takto vytvořené struktury jehel dosahují průměru špičky pod  $1 \mu\text{m}$  s aperturou méně než  $0,2 \mu\text{m}$  a jsou dlouhé přibližně 50-70 mikrometrů v závislosti na tom, jak tlustá vrstva křemíku byla ponechána u kořenů hrotů [126].

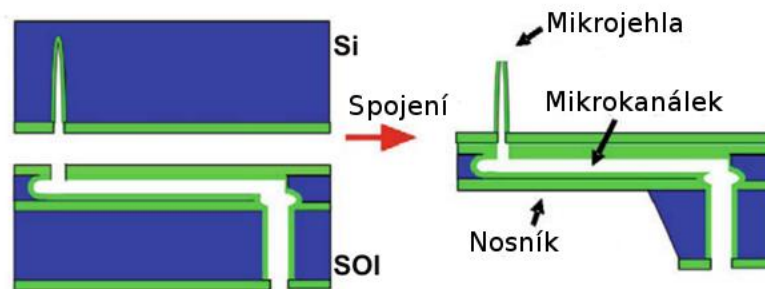


Obr. 3.14 Schéma výroby mikrojehel [126]

Pevnost a šetrnost těchto mikrojehel byla úspěšně testována vpichováním do želatiny [125] [126] a pevnost v ohybu byla analyzována metodou konečných prvků a doplněna experimentálním měřením meze pevnosti v ohybu v závislosti na délce hrotu [126] [123]. Tato závislost se ukázala přibližně jako nepřímá úměrná. Schopnost hrotů dávkovat tekutinu byla ověřena počítačovou analýzou a experimentálně s vodou užitím rozdílů tlaků [127].

V rámci integrace jehel do AFM byl vyroben nosník a čip s mikrokanálky a rezervoárem, ke kterému byla mikrojechla z oxidu křemíku připevněna tzv. *bonding* procesem [123]. Do SOI substrátu (*silicon on insulator*) byly za použití  $\text{SiO}_2$  masky pomocí metody DRIE vyleptány rýhy hluboké asi  $10 \mu\text{m}$  a široké  $3 \mu\text{m}$ . V rýhách byla následně vytvořena vrstva oxidu křemíku vlhkou oxidací. Tato vrstva byla na dně rýhy vyleptána procesem RIE a celé dno bylo dále vyleptáno užitím  $\text{XeF}_2$ , což vedlo ke vzniku kruhové struktury s průměrem asi  $9 \mu\text{m}$  v  $\text{Si}$  substrátu. Nakonec byly zhotoveny vstupy/výstupy mikrokanálek a celá vyleptaná struktura byla znovu podrobena mokré oxidaci pro vznik vrstvy oxidu na stěnách [128]. Takto zhotovený cantilever byl spojen s křemíkovým substrátem s mikrojechlou z oxidu křemičitého zhotovenou dle dříve popsaného postupu. Přebytný křemík byl odstraněn TMAH (hydroxid tetramethylamonný) leptáním. Hrot dlouhý přibližně  $70 \mu\text{m}$  byl tudíž celý odhalený, a proto byla následně za účelem jeho vyztužení proti příčným silám vytvořena u jeho paty křemíková struktura vysoká asi  $55 \mu\text{m}$  [128].





Obr. 3.15 Schéma výroby BioProbe [123]

Funkčnost mikrokanálek byla zdárně ověřena vodou s fluorescenčním barvivem, jež se do nich dopravila kapilárním efektem [128]. Schopnost sondy přesně a šetrně proniknout membránou buňky a zanechat ji živou byla úspěšně otestována na buňkách uložených v roztoku fosfátového pufru s kalceinem. Samotná injekce a extrakce biomolekul nemůže být zajištěna hydrostatickým tlakem, protože tlak potřebný k průchodu kapaliny aperturou hrotu je natolik velký, že dříve sondu rozbil. Pro kontrolované doručení či extrakci biomolekul skrze aperturu hrotu se tedy osvědčilo využití elektrod [128].

BioProbe díky svému dlouhému tenkému hrotu může měřit struktury v dutinách, ale nevýhodou je jeho větší tuhost. Ta způsobuje, že průnik membránou buňky nemusí být jasně detekovatelný [128].

### 3.5 Shrnutí

FluidFM na výbornou plní záměr, se kterým byl vyvinut – nahrazuje mikro/nanopipety v buněčných experimentech. Díky piezokeramickým prvkům umožňuje přesné polohování vůči vzorku a pomocí citlivé silové odezvy může šetrně interagovat s buňkami [2]. Oproti mikropipetám ovládanými mikromanipulátory pod optickým mikroskopem neklade FluidFM vysoké nároky na zručnost operátora a dosahuje mnohem vyšší úspěšnosti při jednobuněčných experimentech. Aplikace FluidFM ale i přesahují oblast užití mikropipet a nachází užití ve více oblastech mikrobiologie (viz Aplikace). FluidFM OMNIUM je zaměřený právě primárně na biologické aplikace. Další oblastí užití je tisk 3D nanostruktur hlavně pomocí elektrochemické depozice kovových iontů. Na tuto oblast je zaměřený systém CERES Print.

V počátcích vývoje dutých sond (viz Vývoj dutých sond) se převážně všechny experimenty prováděly v atmosféře, případně s kontrolovanou vlhkostí. Spoléhalo se na kapilární síly, které hydrofilní mikrokanálky zaplnily a dopravily kapalinu k apertuře dutého hrotu. Využívaly se zejména pro depozici inkoustů, kde byly některé schopny v difuzním režimu dosahovat rozlišení pod 100 nm. (viz Nanofountain Pen). NADIS druhé generace rozšířil použití dutých sond na kapalném prostředí a z něj vycházející komerčně úspěšné FluidFM použití v tomto prostředí dále rozšířilo. Využití externího regulátoru tlaku místo kapilárních sil sice umožnilo téměř libovolnou kapalinu dávkovat v kapalném prostředí a také ji nasávat, ale tisk struktur s rozlišením pod 100 nm v atmosférických podmínkách již nebyl s tímto systémem možný (viz Aplikace). Tato nevýhoda je ale převážena širokou oblastí ostatních aplikací FluidFM.

Femtopipeta s sebou nese nevýhody výrobní metody A – kusová povaha výroby užitím FIB, s tím související vyšší cena a komplexnost *thermal fusion bonding* procesu. Dále nebyl zpětný tok ani demonstrován v kapalině. Výroba BioProbe má kromě komplexnosti a kusovosti navíc nekonzistentní výsledky. A kvůli vyšší tuhosti sondy nelze dobře detekovat kontakt či průraz membrány buněk [128].

FluidFM tak zůstává jako první volba v oblasti systémů skenovacích sond s mikrofluidními kanálky. Tyto duté sondy lze od firmy Cytosurge samostatně zakoupit za cenu přibližně 180 €. Budoucí vývoj se soustředí na rozvoj produktů FluidFM OMNIUM a CERES Print systému a rozvoj v oblastech jejich aplikací.

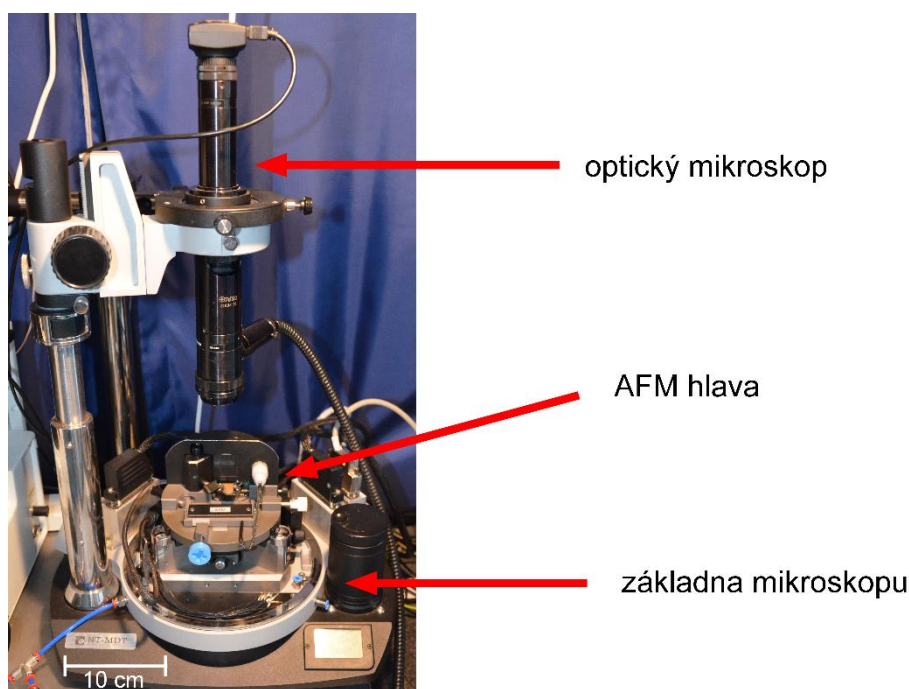
## 4 Environmentální komora a úpravy

Cílem této práce bylo mimo jiné zprovoznit environmentální komoru pro použití na mikroskopu atomárních sil NTegra Prima od ruského výrobce NT-MDT v laboratoři povrchů na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT FSI v Brně. Tato komora má zajistit kontrolu nad vlhkostí v oblasti vzorku a umožnit práci v nízkém vakuu pro přesnější měření. Funkční environmentální komoru by šlo poté mimo jiné využít při experimentech s dutými sondami.

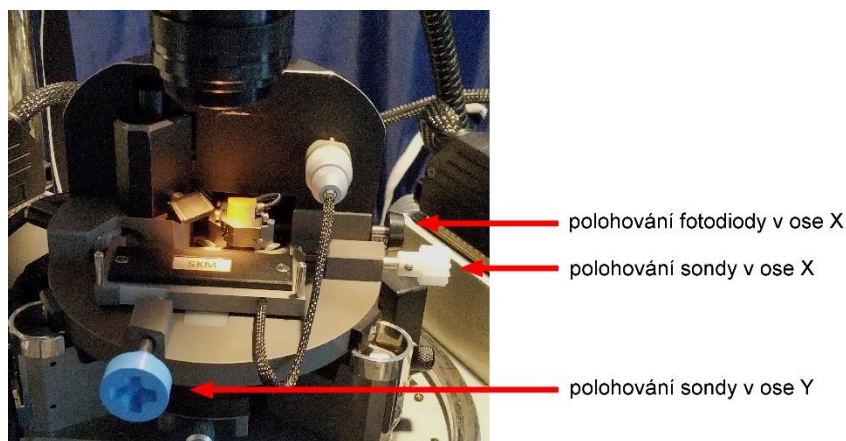
### 4.1 AFM sestava

Mikroskop NTegra Prima je konstruován pro provádění široké škály SPM metod. To je umožněno různými měřicími moduly (hlavami), které lze snadno vyměnit. Hlavy se pokládají na základnu mikroskopu nad měřený vzorek. Používána byla výhradně hlava pro mikroskopii atomárních sil. Tento měřicí modul je založen na rozšířeném způsobu detekce ohybu v AFM – OBD (*optical beam deflection*). Pod hlavou se spolu s podstavcem na vzorek nacházejí šrouby pro hrubé posuny vzorku v horizontálních směrech X, Y (pro volbu těchto os viz obr. 4.2). Systém je doplněn optickým videomikroskopem s koaxiálním osvětlením pro orientaci na vzorku a hrubé přibližování hrotu k němu.

Hlava AFM obsahuje čtyři šrouby určené pro nastavení pozice cantileveru a fotodetektoru vůči paprsku laseru a jeho odrazu (viz obr. 4.2). Fotodetektor je složen ze čtyř fotodiód umístěných do kvadrantů. V ose X zaznamenává torzi nosníku (LF – *lateral forces*) a v ose Y zaznamenává ohyb nosníku (DFL – *deflection*). Před měřením, kdy nedochází k žádnému ohybu či torzi nosníku, je fotodetektor pomocí příslušných polohovacích šroubů posunut tak, aby odražený laser dopadal přesně do jeho středu a parametry DFL a LF byly nulové. Šrouby pro polohování sondy umožňují upravit její pozici vzhledem k laseru tak, aby byl signál laseru odraženého do fotodetektoru maximální. V dalším textu budeme polohovací šroub pro fotodetektor v ose Y (resp. ose X) označovat zjednodušeně jako „DFL šroub“ (resp. „LF šroub“). Podobně budeme šroub pro polohování sondy v ose Y (resp. ose X) označovat jako „SY šroub“ (resp. „SX šroub“).

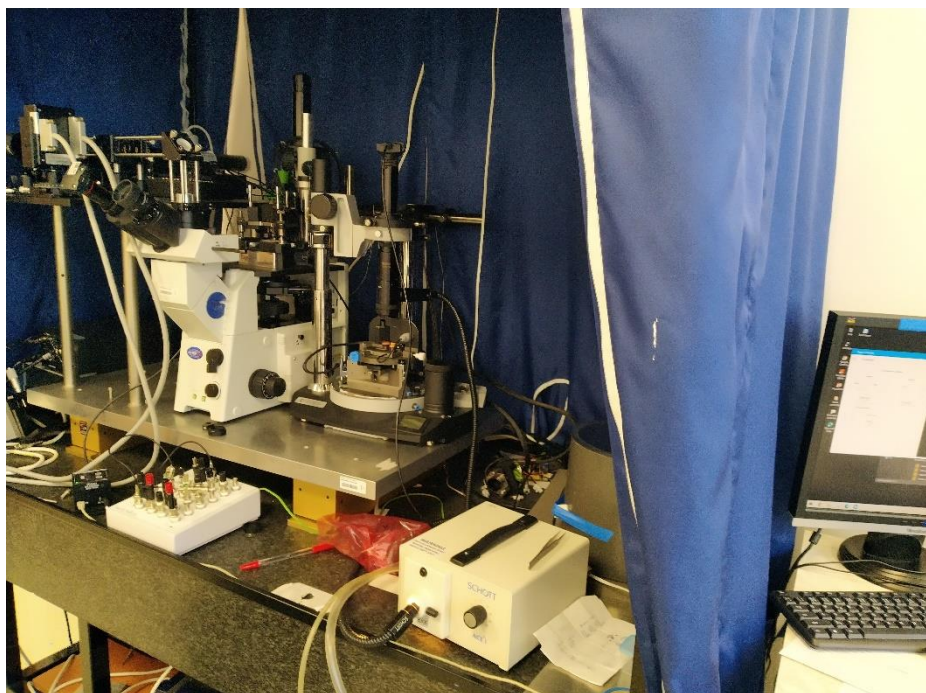


Obr. 4.1 NTegra Prima



Obr. 4.2 Hlava AFM a polohovací šrouby. DFL šroub se nachází na zadní straně hlavy AFM

Sestava je v laboratoři umístěna spolu se sestavou pro SNOM od téhož výrobce na ocelové konstrukci, na které je na gumových podložkách položena žulová deska a na ní aktivní antivibrační stůl. Dále je na vrchní části této konstrukce položena plachta pro případné izolování sestavy od akustických vibrací. Pod žulovou deskou je umístěn kontrolér pro AFM/SNOM a pro aktivní vibrační stůl. Ovládání AFM je zajištěno pomocí softwaru Nova od výrobce. Pro měření v kontaktním módu se v softwaru volily dva hlavní parametry – *setpoint* a *feedback*. *Setpoint* odpovídá velikosti síly, kterou je hrot tlačěn k povrchu, a hodnota *feedback* udává, jak rychle bude systém reagovat na změny v ohybu nosníku sondy.



Obr. 4.3 AFM sestava

Mikroskop NTegra Prima je uzpůsoben pro nasazení vakuové komory a ventily pro napouštění plynu. Výrobce nabízí soupravu s komorou je především určena pro dosažení nízkého vakua (jednotky Pascalů), což zvyšuje přesnost mikroskopických měření (zvyšuje se činitel jakosti sondy). Dosažení vyššího vakua již přesnost tolik nezlepší [129]. Komora disponuje ve víku malým průzorem (průměr asi 5 cm) pro optický mikroskop, který pro

používání s komorou vyžaduje dokoupit čočku pro zvětšení pracovní vzdálenosti. V základu komora neobsahuje příruby pro přímou integraci čidel tlaku, vlhkosti či teploty. Je ale možné dokoupit pro komoru nástavec, co příruby s připojenými čidly obsahuje, a rozšířit tak využití komory pro kontrolu prostředí v oblasti vzorku. Cena takové soupravy již přesahuje 100 tisíc korun a navíc použití nástavce vyžaduje dokoupení prodloužené tyče optického mikroskopu. Nevýhodou této komerční vakuové komory je absence jakýchkoli manipulátorů pro ovládání šroubů hlavy AFM či manipulátorů pro hrubý posun vzorku v osách X a Y, když je komora nasazená.



*Obr. 4.4 Vakuové komory NT-MDT [130]*

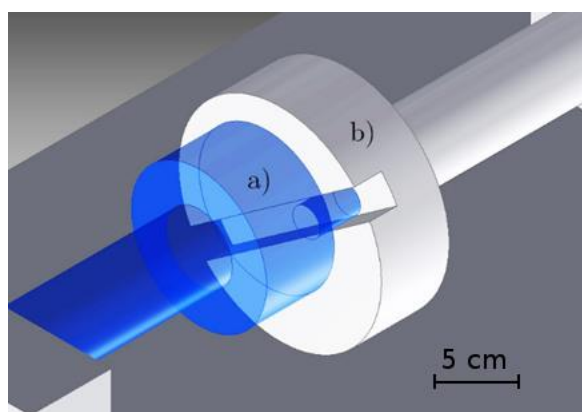
#### **4.2 Environmentální komora pro NTegra Prima**

Vzhledem k absenci mechanických manipulátorů na komerčně nabízené komoře a také absenci přírub při používání komory bez zakoupeného nástavce byla zvolena výroba komory vlastní. Environmentální komoru navrhl a nechal vyrobit v rámci své bakalářské práce Aleš Cáhlik [3]. Jedná se o nerezovou komoru, která disponuje čtyřmi tyčovými manipulátory pro ovládání šroubů na AFM hlavě mikroskopu při nasazené komoře a přírubami pro integraci čidel vlhkosti a tlaku. Environmentální komora má, podobně jako komerčně dostupná varianta, prosklený průzor ve víku. Tento průzor má ale přibližně třikrát větší průměr a poskytuje tudíž větší přehled o sestavě při pohybech s manipulátory či při nasazování komory.

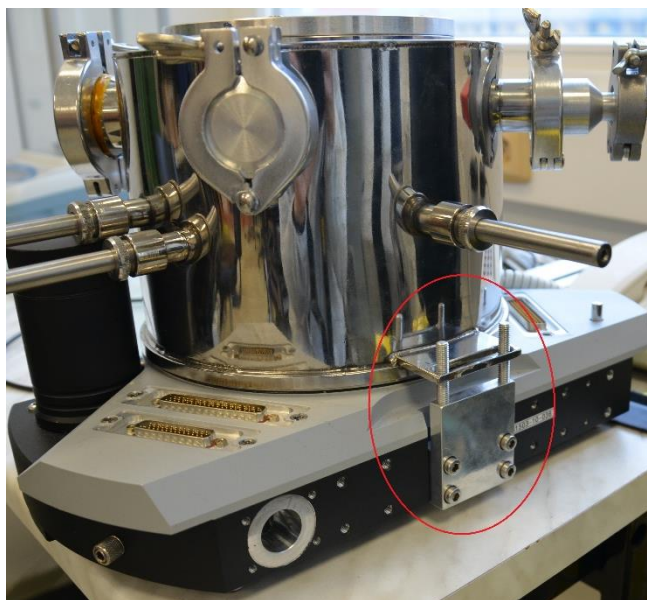


*Obr. 4.5 Model environmentální komory [3]*

Pro přenos krouticího momentu z tyčových manipulátorů na šrouby AFM hlavy byly v rámci bakalářské práce Aleše Cáhlika navrženy speciální koncovky. Tyto koncovky měly umožňovat přenos krouticího momentu i při rovnoběžném vyosení šroubu a manipulátoru až o 3 mm a měly být použity na třech z manipulátorů (viz obr. 4.6). Čtvrtý manipulátor určený k ovládání SX šroubu byl navržen znatelně rovnoběžně vyosený, protože docházelo ke kolizi s ovládacím prvkem základny mikroskopu určený pro hrubý posuv vzorku v ose Z (směr kolmý na povrch vzorku). Proto bylo navrženo použít pro přenos krouticího momentu z tohoto manipulátoru na šroub čelního ozubeného soukolí [3]. Koncovky včetně ozubeného soukolí měly být vytištěny na 3D tiskárně. Pro udržení manipulátorů rovnoběžně s příslušnými šrouby je komora opatřena madly a na AFM sestavu byla vyrobena speciální konzole, na kterou se jedno z madel nasune (viz obr. 4.7).



Obr. 4.6 Modely koncovek: a) koncovka manipulátoru, b) koncovka šroubu [3]



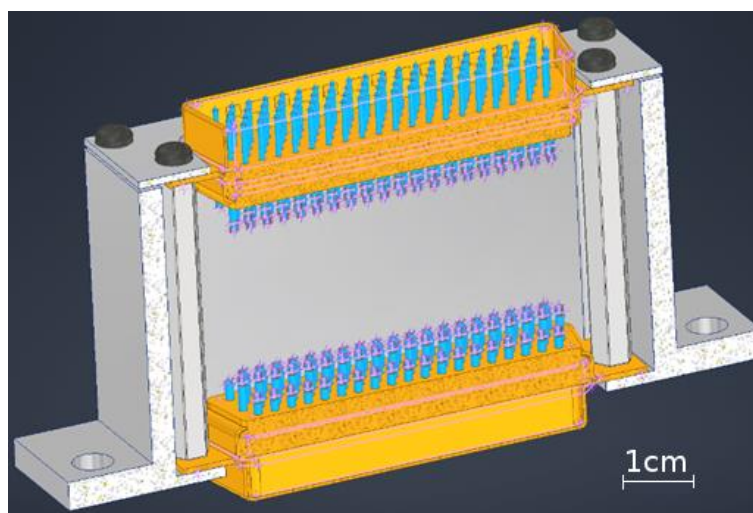
Obr. 4.7 Pohled zezadu na AFM sestavu s komorou. Červeně madlo s konzolí.

Výroba komory byla dokončena se zpožděním, v roce 2014. Navržené koncovky manipulátorů a šroubů nebyly realizovány a komora nebyla pro generování nízkého vakua na mikroskopu NTegra Prima nebyla zprovozněna. Na AFM sestavě se používala pro regulaci vlhkosti za atmosférických podmínek. Dále byla používána samostatně s nerezovým dnem [3] pro kontrolu atmosféry i za podmínek nízkého vakua při testování nanosenzorů. K čerpání komory se využívá rotační olejová vývěva.

V rámci zprovoznění manipulátorů bylo Ing. Jindřichem Machem, Ph.D. navrženo a vytisknuto čelní ozubené soukolí pro manipulátor ovládající SX šroub a kuželovité soukolí pro manipulátor SY šroubu (viz obr 4.8). Tato ozubená kola jsou viditelná i na obrázcích 4.1 a 4.2. Dále byly Ing. Michalem Paverou, Ph.D. a Ing. Zdeňkem Nováčkem, Ph.D. navrženy a zhotoveny funkční těsnicí nástavce na vnější konektory (konektory na základně AFM nacházející se mimo environmentální komoru), jelikož pronikal při čerpání vzduch.



Obr. 4.8 Čelní ozubené soukolí a kuželové soukolí (šrouby M4)



Obr. 4.9 Model těsnicího nástavce na konektor

### 4.3 Testování a úpravy environmentální komory

V rámci bakalářské práce byla environmentální komora v kombinaci se sestavou AFM testována, byly stanoveny její funkční nedostatky a byla navržena a případně realizována jejich náprava.

#### 4.3.1 Vyosení manipulátorů

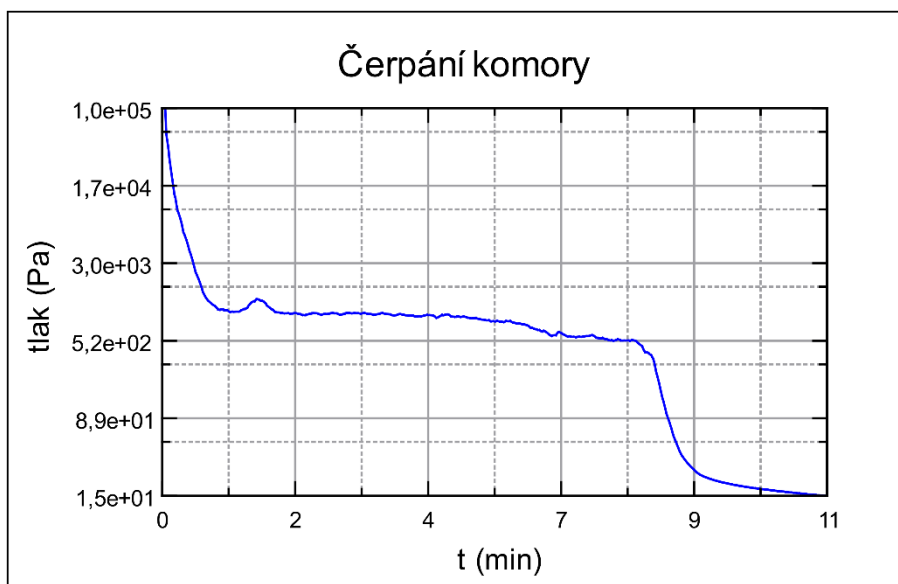
Zhotovené těsnicí nástavce pro vnější paralelní porty znamenaly zvýšení celého konektoru do míry, že začal zavazet manipulátoru LF šroubu (viz obrázek 4.10). Bylo tedy nutné provozovat komoru lehce natočenou vůči plánované poloze v matematicky záporném směru. To vedlo k významnému vyosení manipulátorů vůči šroubům (4 mm) a mírné odchylce v jejich rovnoběžnosti. Konzole v zadní části AFM základny tedy musela být odstraněna, protože neumožňovala nasadit komoru mírně natočenou. Kuželovité soukolí důsledkem tohoto natočení komory zcela ztratilo svoji funkčnost. Jediným funkčním manipulátorem tedy zůstal manipulátor SX šroubu, kde se mírné natočení na funkci ozubeného soukolí nepodepsalo. Navíc chyběl manipulátor pro ovládání LF šroubu a místo něj byla v komoře provizorně umístěna jednoduchá tyč. Byl tedy vyroben manipulátor nový dle původního výkresu Aleše Cáhlika.



*Obr. 4.10 Vlevo pohled na manipulátory SX a LF šroubu. Vpravo detail vyosení kuželovitého soukolí*

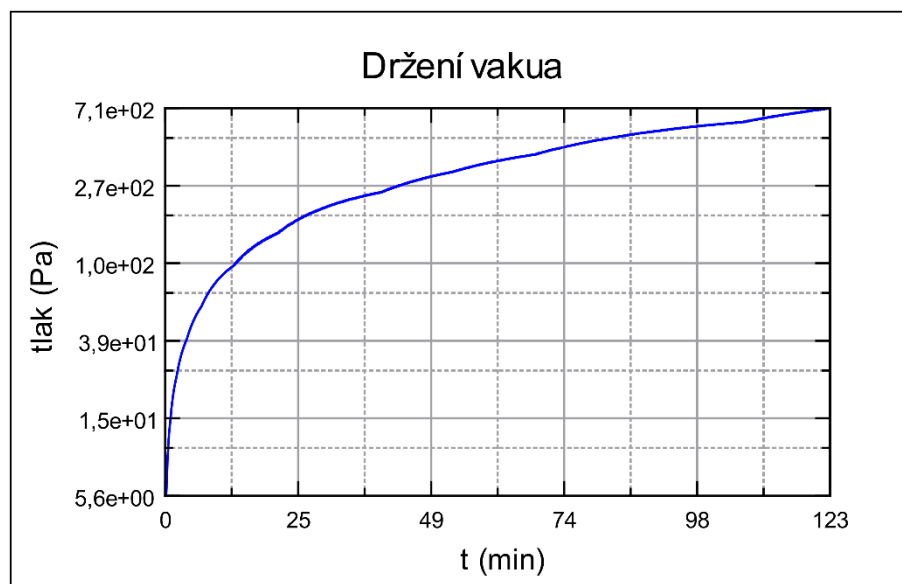
### 4.3.2 Testování vakua

K AFM sestavě byla připojena rotační olejová vývěva a byla ověřena schopnost této sestavy s komorou dosáhnout nízkého vakua. Tlak byl měřen pomocí Piraniho měřky zavedené do jedné z přírub komory. Test vakua proběhl úspěšně. Nejnižší dosažený tlak v komoře po více jak půl hodině čerpání byl trochu pod 5 Pa, což je řádově nízké vakuum dostatečné pro dobré zvýšení přesnosti mikroskopických měření. Na grafu čerpání (obr. 4.11) lze pozorovat zastavení poklesu tlaku kolem  $10^3$  Pa. To je způsobeno nejspíše dočasnou netěsností komory.



*Obr. 4.11*





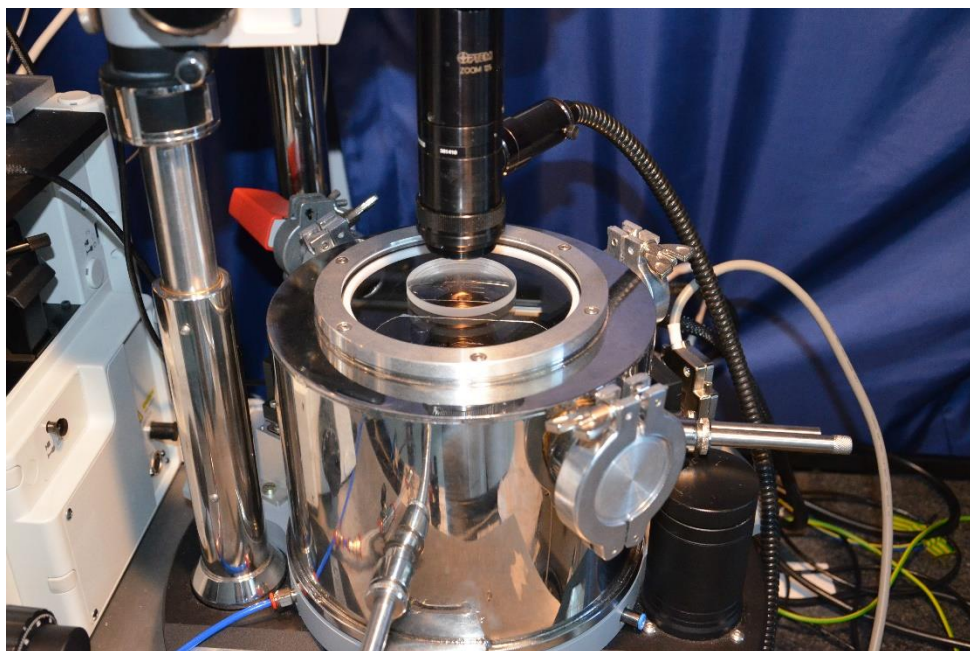
Obr. 4.12

Vzhledem k zmíněnému natočení komory byl pozorován kontakt manipulátoru SX šroubu s ovládacím prvkem pro hrubé posuny vzorku v ose Z. K tomuto kontaktu dochází pouze při odčerpané komoře, kdy se zdeformuje O-kroužek komory o 0,8 mm a komora tak zcela přilehne na dosedací kruh základny mikroskopu. Tento kontakt mírně omezuje používání zmíněného manipulátoru ve vakuu.

#### 4.3.3 Posun při vakuování a optický mikroskop

V dalším textu bylo i bez všech funkčních manipulátorů provedeno měření kalibrační mřížky s obdélníkovými výstupky ve vakuu (viz Měření topografie ve vakuu). Při něm bylo zjištěno, že při nasazení komory a vakuování dochází k relativnímu posunu hrotu a vzorku. Pro stanovení tohoto posunu bylo provedeno pozorování na větší struktuře (viz Měření nefunkčního UV senzoru grafen/GaN). Posuv při nasazování komory přesahoval i 0,5 mm. Takto veliký posuv byl způsoben O-kroužkem. Ten byl v drážce komory umístěn volně a bylo potřeba jej vždy před nasazením komory položit na dosedací kruh AFM základny. Následně musel kroužek do nasazované komory zapadnout, což bylo většinou spojeno s relativním posuvem vzorku a hrotu. Problém byl vyřešen koupí O-kroužku s menším velkým průměrem, který se navléknul na vnitřní stěnu drážky komory a držel v ní pomocí tření. To minimalizovalo posuny při nasazování komory na jednotky mikrometrů. Pro omezení rizika posuvu v důsledku kontaktu manipulátoru se šroubem při nasazování bylo jedno z ozubených kol soukolí na funkčním manipulátoru zkráceno.

Pro určení posuvu způsobeného vakuováním bylo nutné zajistit pozorování vzorku optickým mikroskopem při nasazené komoře. Bylo tedy potřeba zvětšit pracovní vzdálenost mikroskopu. Za tímto účelem byla obstarána rozptylná čočka. Tu jsme položili na průhledné víko komory. Toto řešení, byť je funkční, bude do budoucna vyžadovat úpravu, protože kvalita obrazů není zcela uspokojivá (viz Měření nefunkčního UV senzoru grafen/GaN). Při nasazené komoře a zaostření na vzorek se navíc optický mikroskop pohybuje velice blízko horní hranici rozsahu svého pohybu v ose Z. Pro účely této bakalářské práce však bylo toto řešení uznáno jako postačující.

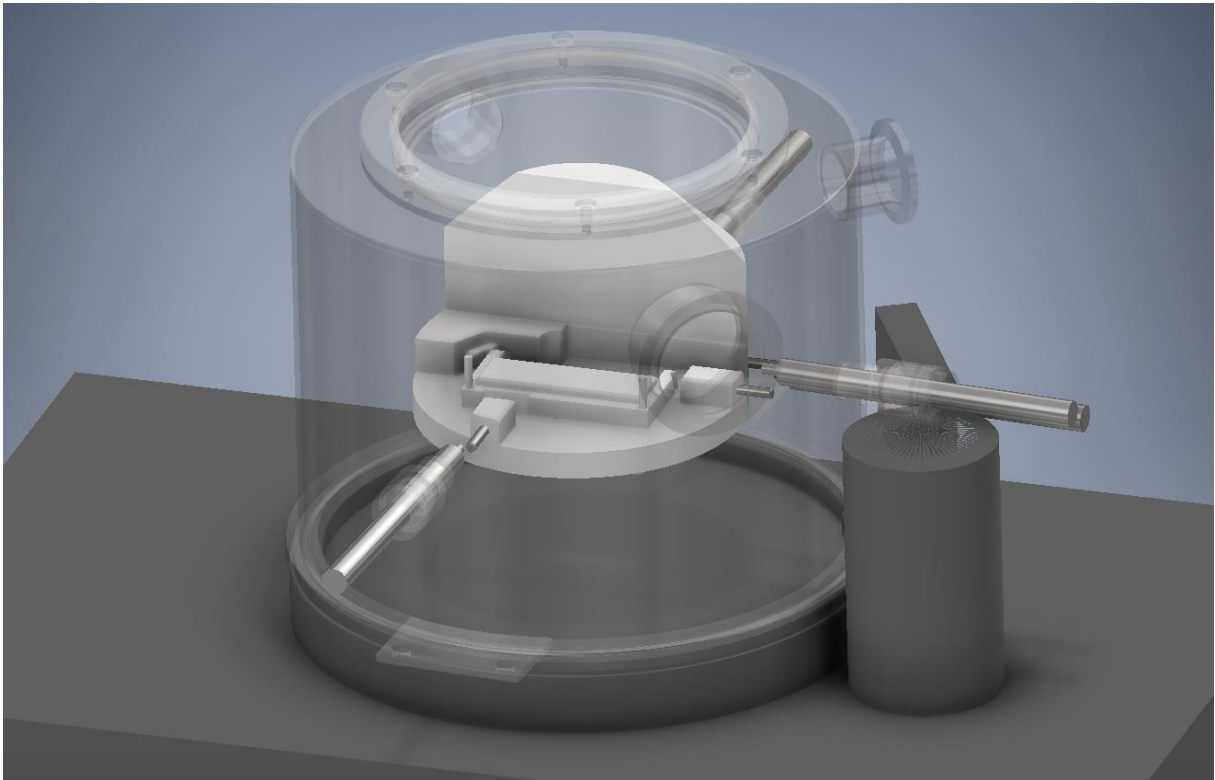


*Obr. 4.13 Pohled na komoru s optickým mikroskopem a rozptylnou čočkou*

S funkčním optickým mikroskopem pro pozorování vzorku s nasazenou komorou bylo provedeno měření na vyřazeném senzoru (viz Měření nefunkčního UV senzoru grafen/GaN). Tato struktura byla dostatečně přehledná pro pozorování posuvu. Posun při samotném vakuování byl stanoven přibližně na 200  $\mu\text{m}$ . To přesahuje rozsah 100  $\mu\text{m}$  integrovaného piezoskenneru a pro korigování tohoto posuvu by bylo zapotřebí možnosti ovládat hrubý posuv vzorku v osách X a Y při nasazené komoře. Soudíme, že řešením by byla instalace krokových motorků do komory pro ovládání těchto posuvů. Podobný závěr byl ostatně učiněn již v bakalářské práci Aleše Cáhlika [3]. Implementace krokových motorků bude předmětem další práce.

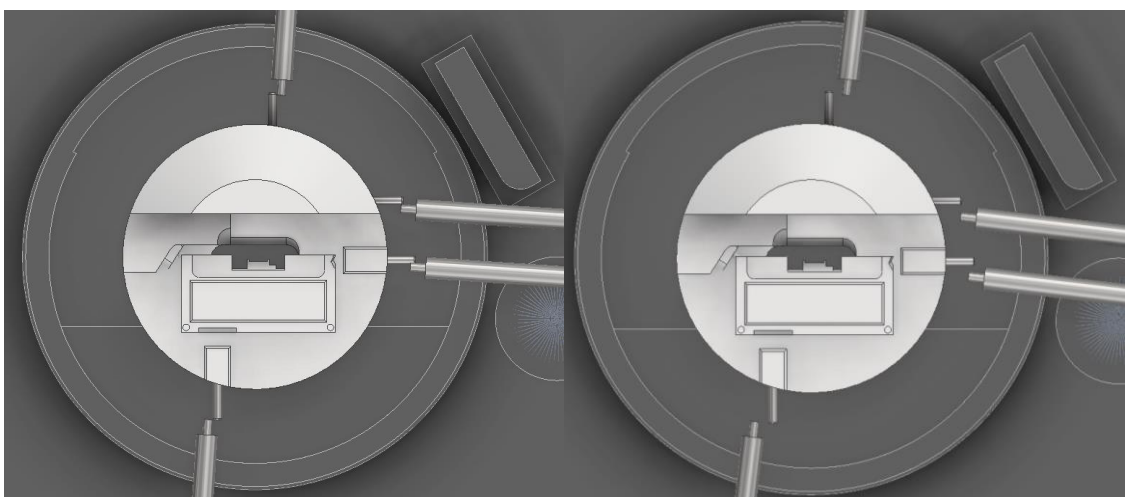
#### **4.3.4 Návrh nástavce pro environmentální komoru**

V rámci návrhu řešení na zprovoznění manipulátorů komory byla v softwaru Autodesk Inventor Professional 2021 vyhotovena sestava skládající se ze zjednodušené základny AFM, environmentální komory a měřicí hlavy AFM. Model komory byl použit z bakalářské práce Aleše Cáhlika [3] a model hlavy AFM laskavě poskytnul Ing. Michal Pavera, Ph.D.



*Obr. 4.14 Model celé sestavy*

Nenabízela se žádná realizovatelná úprava či předělání těsnicích nástavců vnějších paralelních portů, které by umožnilo komoru natočit zpět do původní polohy, s níž počítal její návrh. Šrouby a manipulátory jsou významně vyoseny, ale ne natolik, aby neumožnili použití čelního ozubeného soukolí (viz obrázek 4.15). První myšlenkou bylo tedy natočení komory dále zvětšit, aby se zvětšilo horizontální vyosení a čelní ozubené soukolí se dalo použít (viz obr 4.15). Kromě vyosení by se ještě zvětšila odchylka os manipulátorů a šroubů, což by vedlo k situaci, že by jedno z kol případného čelního ozubení zabíralo pouze svojí hranou. Tato skutečnost byla ale shledána funkčně přípustnou.



*Obr. 4.15 Pohled shora na model sestavy. Vlevo původní vyosení. Vpravo plánované vyosení..*

Pro realizaci dalšího natočení v matematicky záporném směru bylo třeba nadzvednout komoru o pár milimetrů, aby se nezhoršil již zmíněný mírný kontakt manipulátoru SX šroubu s ovládáním hrubého posuvu vzorku v ose Z. Zároveň nesmělo být nadzvednutí příliš velké, protože by se optický mikroskop již neměl kam dál nahoru posouvat. Byl navržen 4 mm silný obručový nástavec s drážkou pro O-kroužek, který by se vložil mezi dosedací obruč základny AFM a komoru. Uchycení nástavce bylo zamýšleno pomocí tří výstupků s dírami na jeho vnitřním obvodu, do kterých by se následně s přesahem uložily kolíky. Kolíky by byly v kontaktu s vnitřním poloměrem dosedací obruče základny AFM a bránily by v posunu nástavce. Cena zakázky na výrobu tohoto nástavce z nerezové oceli byla od firmy Tecpa s. r. o. stanovena na necelých pět tisíc korun a trvala by půl měsíce. Vzhledem k tomu bylo nejdříve přistoupeno k vytištění upraveného nástavce na 3D tiskárně, za což bych chtěl poděkovat Ing. Zbyňku Dostálovi, Ph.D.

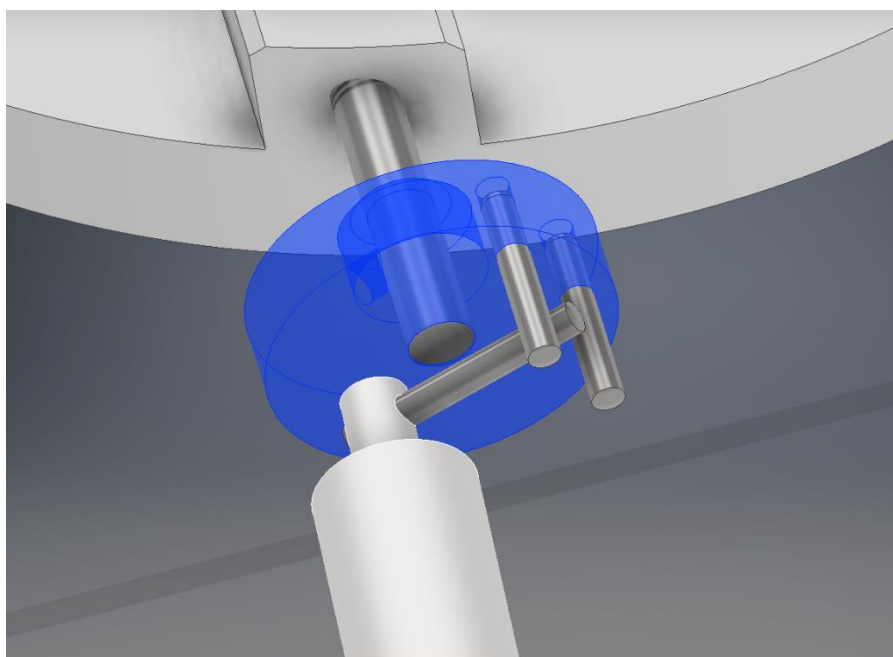


*Obr. 4.16 Vytištěný model nástavce*

Vytištěný model nesplňoval potřebné nároky na jemnost těsnicích ploch a při čerpání by pravděpodobně dostatečně netěsnil. S jeho pomocí byl ale odhalen špatný návrh těsnicího prvku. Zakoupený O-kroužek, který byl zvolen pro svoji dostupnost a širokou nabídku, byl příliš malý na to (malý průměr 2 mm), aby se dal prakticky do mělké drážky (1,5 mm) jakkoli dostat a udržet v ní. Nástavec navíc způsoboval dodatečné vyosení manipulátorů ve vertikálním směru, se kterým nebylo v prvotní úvaze počítáno. Z těchto důvodů bylo od této myšlenky na zprovoznění manipulátorů upuštěno.

#### **4.3.5 Návrh nových koncovek**

Druhou myšlenkou pro zprovoznění manipulátorů komory bylo navržení speciálních koncovek, které budou schopny přenést krouticí moment mezi dvěma osami – manipulátorem a šroubem – i když jsou horizontálně vyosené a nejsou vzájemně rovnoběžné. Měly být tedy schopny přenášet krouticí moment v případě natočení komory způsobeným vysokým těsnicím nástavcem jednoho z vnějších konektorů. Po návrzích různých speciálních vnitřních ozubených soukolí či soukolí kuželovitých a poradě s Ing. Michalem Paverou, Ph.D. bylo dosaženo finálního designu koncovek (viz obr 4.17).



*Obr. 4.17 Model navržených koncovek*

Takto navržené koncovky skýtají mnoho výhod. Jsou schopné přenášet krouticí moment mezi osami vyosenými až o více jak 4 mm a také osami mírně nerovnoběžnými. Průchozí díry a uložení s přesahem poskytuje jistou volnost při volbě polohy koncovky na šroubu a volbě délek vystupujících kolíků. To umožňuje další adaptaci na konkrétní vzájemnou polohu os. Manipulátory jsou při operaci ve vakuu tlačeny vnější atmosférou do komory. To způsobuje riziko nekontrolovatelného kontaktu manipulátoru s příslušným šroubem a nechtěnému přenosu axiálních sil na hlavu AFM, což může narušit měření. Navržené koncovky mohou přenášet krouticí moment ve větším rozsahu vzájemných poloh manipulátoru a šroubu díky zmíněným dlouhým ocelovým kolíkům. To poskytuje větší prostor pro včasné vykompenzování sil působících na manipulátor kvůli vakuu v komoře a omezení rizika přenosu axiálních sil na hlavu AFM. Koncovky navrhnuté Alešem Cáhlikem mají riziko přenosu axiálních sil vyšší, nejsou schopny pracovat s vyosením přes 3 mm a nerovnoběžnými osami a docházelo by mezi nimi k trochu většímu tření kvůli navrhnutému materiálu. Kuželovité soukolí navrhnuté Ing. Jindřichem Machem, Ph.D. nesnese prakticky žádné vyosení či nerovnoběžnost os a je velice náchylné na přenos axiálních sil. Možnou nevýhodou navržených koncovek je, že neotáčejí šroubem konstantní úhlovou rychlostí. Tento nedostatek ale není přílišného významu v kontextu požadované funkce.



*Obr. 4.18 Vyrobené šrouby s koncovkami*

Pro realizaci návrhu bylo zapotřebí vyrobit náhradní šrouby, jelikož originální šrouby měřicí AFM hlavy měly hlavičky nerozebíratelné. Byly adaptovány výkresy šroubů zhotovené v rámci bakalářské práce Aleše Cáhlika a zakoupena závitová kruhová čelist s příslušným průměrem a stoupáním. Koncovky pro šrouby hlavy AFM byly zhotoveny na 3D tiskárně. Následně byly na jejich obvod s přesahem uloženy dva ocelové kolíky a doprostřed taktéž s přesahem samotné nové mosazné šrouby. Vytisknutý model navíc disponuje dírou příčně na osu šroubu, do které může být případně našroubován kus závitové tyče, který by koncovku na šroubu přidržel a zabránil jejímu protáčení. Koncovka pro manipulátor nevyžadovala žádnou složitou výrobu. Bylo pouze zapotřebí vyvrtat do manipulátorů díry a s přesahem do nich uložit ocelové kolíky. Koncovky byly vyrobeny a jejich funkčnost byla úspěšně ověřena.

## 5 Měření ve vakuu a implementace FluidFM sondy

### 5.1 Měření topografie ve vakuu

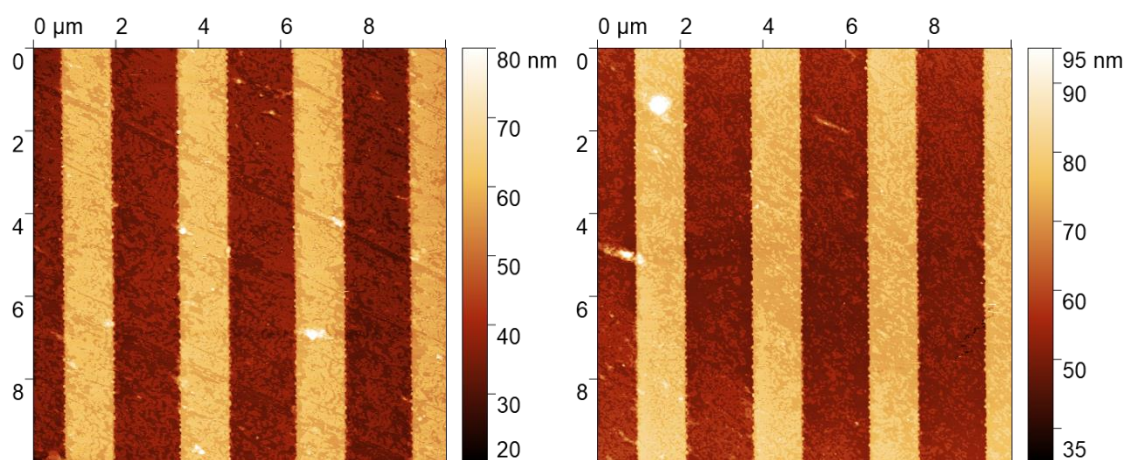
Bylo provedeno měření topografie kalibrační mřížky s profilem obdélníkových schodů v podmínkách nízkého vakua. Cílem bylo vyzkoušet environmentální komoru při AFM měření, objevit případné nedostatky při jejím používání a případně porovnat naměřenou topografii s topografií naměřenou v atmosféře. Měření probíhalo v kontaktním módu a byla pro ně použita sonda od firmy Bruker s hliníkovou odrazivou vrstvou. Délka nosníku této sondy činila 450  $\mu\text{m}$ , šířka 35  $\mu\text{m}$  a tloušťka 1,8  $\mu\text{m}$ . Tuhost udávána výrobcem byla 0,1 N/m a rezonanční frekvence 10 kHz.

Nejprve se provedlo měření v atmosféře bez nasazené komory. Hodnota DFL a LF byla zkorigována na nulu. Síla signálu laseru činila 31,7. DFL se při nastavování polohy vzorku odchýlilo na hodnotu 0,2. Bylo provedeno přiblížení se *setpointem* 1,2. Měřena byla oblast 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  rychlostí 8  $\mu\text{m/s}$ . *Setpoint* pro měření byl zvolen 2,5 a *feedback* 0,8. Naměřená topografie je zachycena na obrázku 5.1. Po měření a oddálení hrotu z kontaktu byla hodnota DFL 0,8. LF a součtový signál zůstal beze změny.

Následně byla nasazena komora. To vedlo ke ztrátě možnosti pozorovat vzorek optickým mikroskopem, protože v době měření ještě nebyl pro použití s komoru uzpůsoben. DFL se při nasazení změnilo z 0,8 na -1,3. V komoře se ponechala atmosféra, hrot se přivedl zpět do kontaktu s mřížkou (*setpoint* -0,3). Proběhlo měření při set pointu 1 a ostatních parametrech totožných s měřením předchozím za účelem ověření, zda nasazení komory ovlivnilo pozici hrotu vůči vzorku. Zjištěno bylo posunutí kolem 4  $\mu\text{m}$ , což se v kontextu příštích měření (viz Měření nefunkčního UV senzoru grafen/GaN) ukázalo jako štěstí. Po dokončení měření a oddálení hrotu bylo DFL -4.

Komora se začala čerpat a DFL se velmi měnilo. Později se ustálilo na hodnotě 0,1. Po vyčerpání komory na 5 Pa se provedl přiblížení (*setpoint* 1) a následovalo měření se *setpointem* 2,3 a stejnými parametry jako při předchozích dvou měřeních. Naměřenou topografii je na obrázku 5.1. Hrot se nacházel na zcela jiném místě mřížky a i při zvětšení zorného pole (30  $\mu\text{m}$  x 30  $\mu\text{m}$ ) nebylo původní místo nalezeno. K tomu přispěl taky fakt, že kalibrační mřížka z logiky věci nemá, až na nějaké nečistoty, žádné význačné struktury usnadňující orientaci.

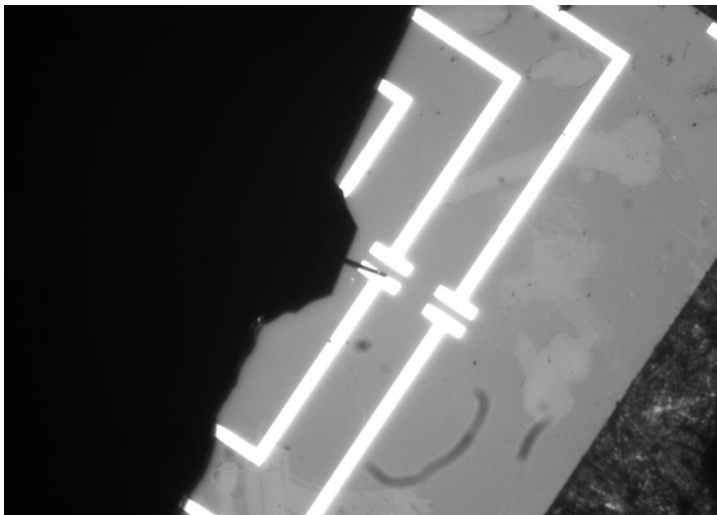
Celý proces těchto tří měření byl zopakován při vypouštění vakua a to se zcela stejným závěrem – při nasazování komory a vakuování vzniká relativní posun vzorku a hrotu.



Obr. 5.1 Vlevo topografie mřížky v atmosféře. Vpravo topografie ve vakuu.

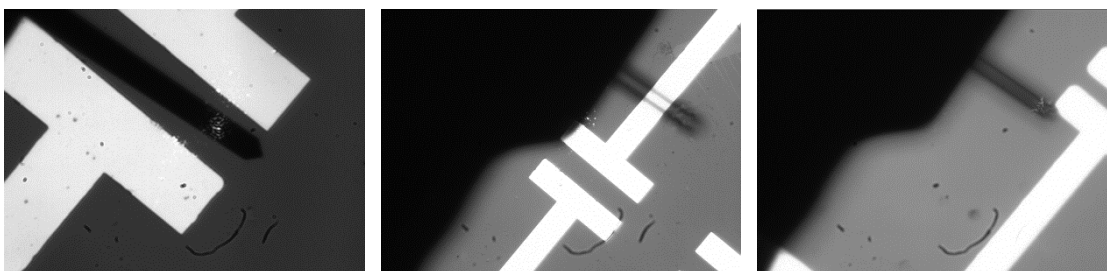
## 5.2 Měření na nefunkčním UV senzoru grafen/GaN

Byla obstarána struktura, na které je snadné se zorientovat a stanovit tak posun při nasazování komory a při vakuování. Jednalo se o jeden zničený UV senzor grafen/GaN využívaný v rámci bakalářské práce Marka Kostky [131]. Struktura obsahuje zlaté elektrody vysoké asi 100 nm a vzájemně vzdálené asi 100  $\mu\text{m}$ .



Obr. 5.2 Pohled na elektrody optickým mikroskopem

Pro pozorování posuvu byl použit stejný typ sondy jako při měření kalibrační mřížky ve vakuu. Hrot byl přiblížen nad jednu z mezer mezi elektrodami (viz obr 5.3). Komora byla nasazena a sundána a změna vzájemné polohy vzorku a hrotu byla zachycena optickým mikroskopem (viz obr 5.3). Tento proces byl několikrát opakován. Pozorovaný posuv přesahoval i 0,5 mm. Přisouzeno to bylo hlavně procesu nasazování komory, kdy těsnicí O-kroužek náhle sjel do drážky komory.



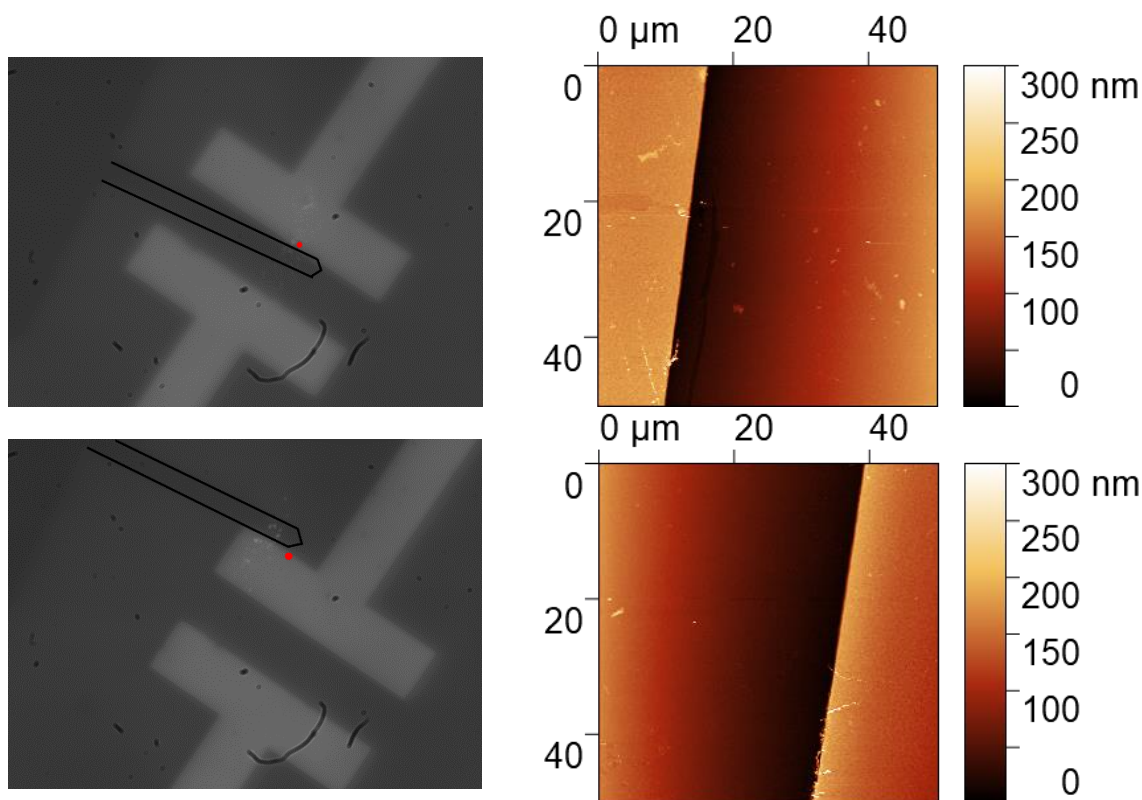
Obr. 5.3 Vlevo původní poloha hrotu. Uprostřed a napravo polohy po nasazení komory

Po uzpůsobení optického mikroskopu pro použití s nasazenou komorou a koupi nového O-kroužku (viz Posun při vakuování a optický mikroskop) bylo provedeno další měření na této struktuře za účelem zjistit posun při samotném vakuování. Pro měření byl použit stejný typ sondy jako v předešlých měřeních.

Hrot byl umístěn nad mezeru mezi elektrodami. DFL a LF bylo nastaveno na hodnotu 0,0. Laser dosahoval hodnoty 30,3. Na sestavu byla nasazena komora. DFL bylo 0,5 a LF -0,2. Byl provedeno přiblížení (*setpoint* 1,5) a následovalo měření hrany elektrody. Rozsah skenu byl zvolen 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ . Skenovalo se rychlostí 14,2  $\mu\text{m/s}$  se *setpointem* 2,5 a *feedbackem* 1. Dále byla na hraně elektrody změřena F-d křivka s časy měření 1 s a 5 s (viz obr 5.5). Po tomto měření bylo DFL -0,3 a LF -0,3.

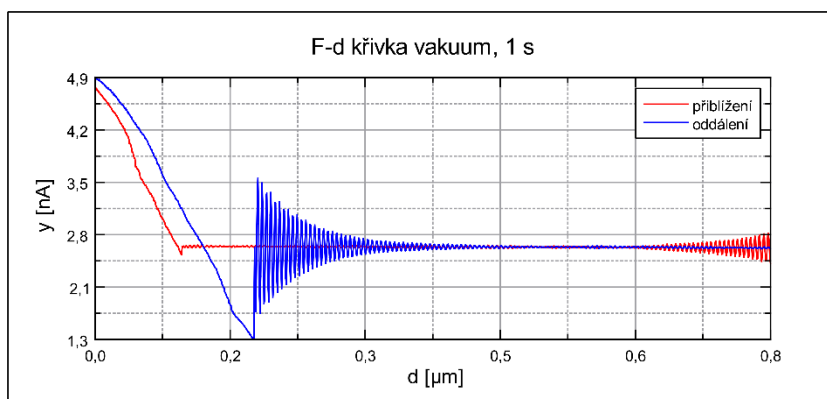
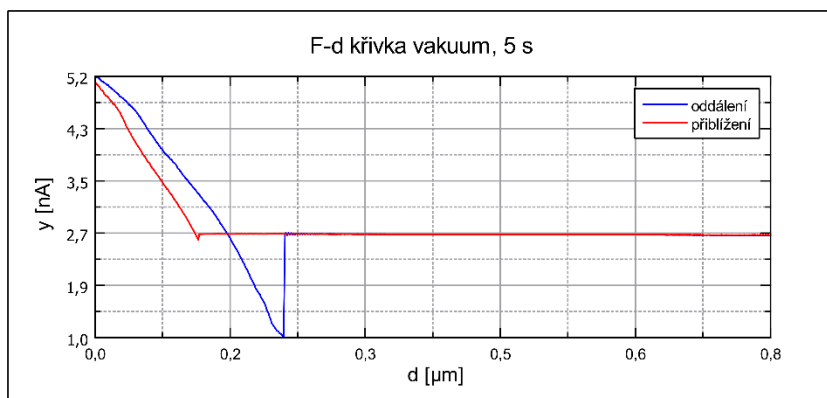
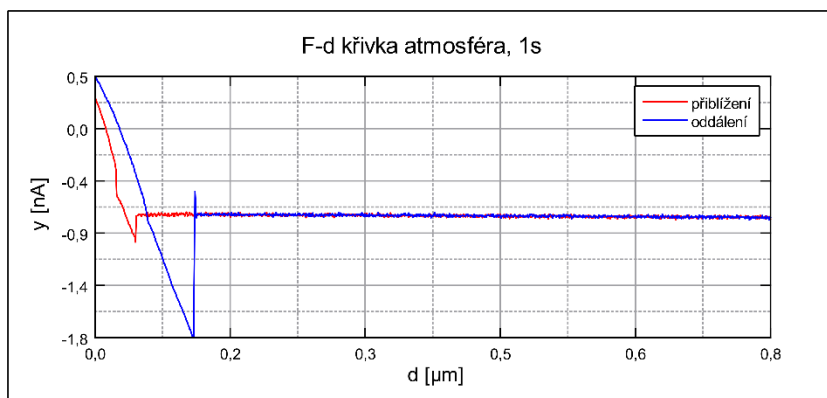
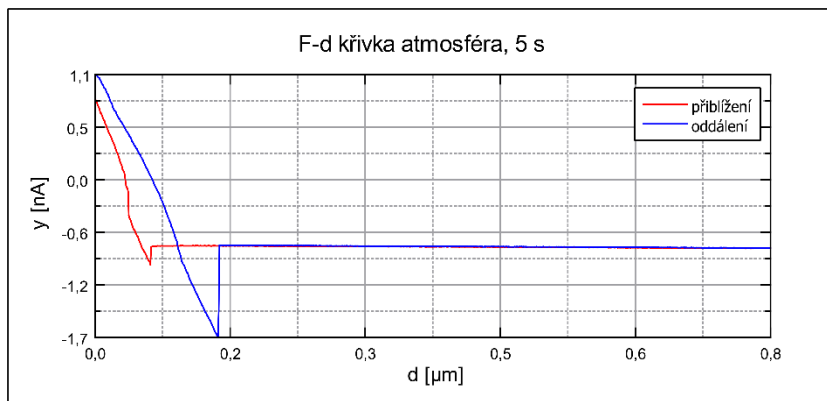


Následovalo vakuování. Optickým mikroskopem byl v prvních sekundách čerpání pozorován posun hrotu vůči vzorku (viz obr 5.4). DFL začalo růst do hodnot nad 2, potom klesat, a nakonec znovu růst, až se ustálilo na hodnotě 3,4. LF nabývalo hodnoty -0,5 a síla součtového signálu 30,9. Bylo dosaženo tlaku 5 Pa. Na novém místě bylo ve vakuu provedeno přiblížení (set point 4,4) a sken s týmiž parametry jako předtím za atmosférických podmínek (set point 5,4). Na hraně elektrody byla opět změřena F-d křivka s časy měření 1 s a 5 s (viz obr 5.5).



Obr. 5.4 Vlevo místa měření (nahore v atmosféře, dole ve vakuu). Červeně vyznačeno místo měření F-d křivky). Vpravo naměřená topografie pro příslušné místo.

Po napuštění atmosféry se hrot vrátil přibližně na stejné místo, na kterém se nacházel před samotným čerpáním. Posun vzniklý vakuováním byl z rozměrů elektrod stanoven přibližně jako 200  $\mu\text{m}$ . Teoreticky by se měla ve vakuu snižovat síla nutná k odtržení hrotu od vzorku a změna by měla být pozorovatelná na F-d křivce. Ve vakuu se totiž redukuje vodní meniskus mezi hrotem a vzorkem a tím i kapilární síly mezi nimi. Naměřené F-d křivky nemohou být ale přímo srovnány, jelikož nebyly pořízeny na stejném místě. Na F-d křivce pořízené z 1 sekundu ve vakuu lze pozorovat oscilace. Tyto oscilace jsou přítomné i na F-d křivce pořízené za 1 sekundu v atmosféře, ale jsou mnohem více tlumené. To svědčí o zvýšení činitele jakosti při měření ve vakuu.



Obr. 5.5

### 5.3 Implementace FluidFM sond a měření kalibrační mřížky

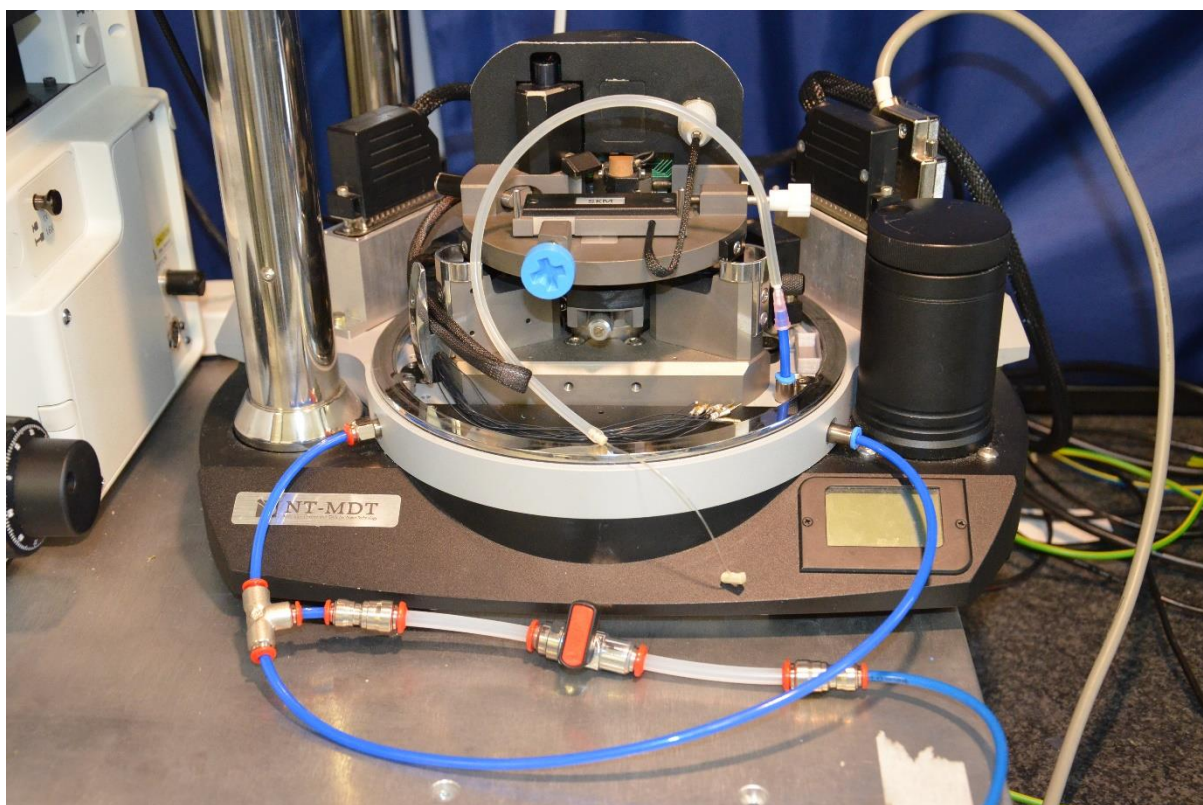
V práci jsme představili FluidFM systém. Jeho komerčně dostupných dutých sond by mohlo jít využít u nás v laboratoři k selektivní depozici nanostruktur ve vakuu či řízené atmosféře a pro úpravu již existujících struktur. Pro ověření této hypotézy byla provedena implementace FluidFM sond do mikroskopu atomárních sil NTegra Prima.

NTegra Prima nepatří mezi mikroskopy, které umožňují instalaci do FluidFM ADD-ON. Spolupráce mezi firmami NT-MDT a Cytosurge není navázána (k roku 2022). NTegra Prima má navíc zcela odlišnou konstrukci oproti podporovaným AFM sestavám a lze tedy s jistotou říci, že instalaci do FluidFM ADD-ON nikdy v budoucnu podporovat nebude, i kdyby byla spolupráce mezi firmami navázána. Pro mikroskop tedy není dostupná kompletní souprava pro provádění experimentů s dutými sondami, jejíž schopnosti jsou uvedeny v sekci Produkty v kapitole FluidFM. Cílem byla pouhá integrace samostatně zakoupených FluidFM sond do tohoto AFM.

Byly zakoupeny FluidFM sondy Micropipette, Nanopipette a Nanosyringe určené pro FluidFM ADD-ON pro mikroskop Nanosurf FlexAFM. Design držáků těchto sond je popsán v kapitole Vývoj prvního prototypu. Tento design samozřejmě nebyl kompatibilní s uchycením sond využívaným mikroskopem NTegra Prima. Z tohoto důvodu byla Ing. Michalem Paverou, Ph.D. navržena nová platforma pro hlavu AFM pro uchycení těchto dutých sond, která byla následně vytištěna na 3D tiskárně (viz obr). Dále byla zakoupena souprava pneumatického konektoru, aby bylo možné do duté sondy přivádět tekutiny. Sestavení a testování pneumatického konektoru bylo provedeno Ing. Zdeňkem Nováčkem, Ph.D.

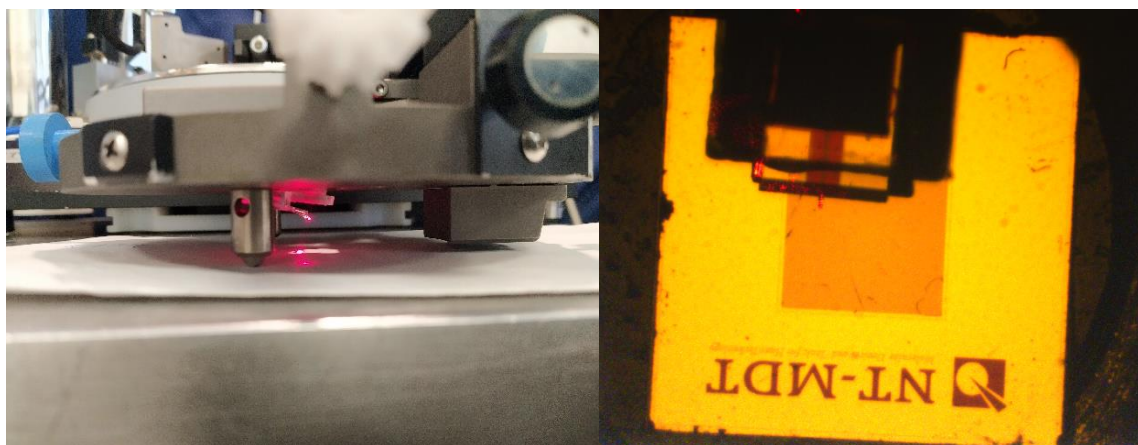


Obr. 5.6



Obr. 5.7

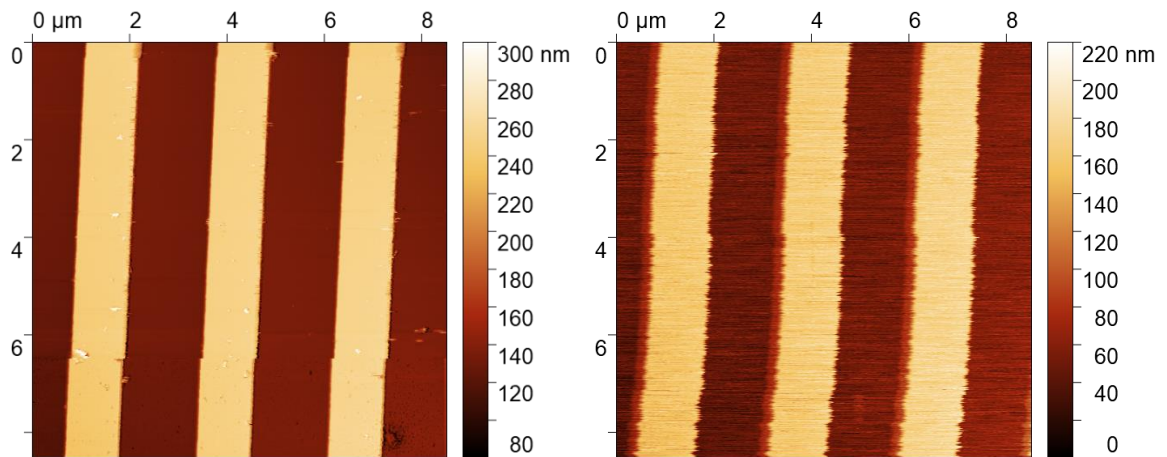
Na platformu byla umístěna sonda Nanopipette s tuhostí 0,6 N/m. Bylo konstatováno, že nasazování FluidFM sond na vytisknutou platformu bylo mnohem jednodušší, než nasazování normálních sond na platformu původní. Po nastavení pozice sondy a fotodetektoru bylo zjištěno, že síla signálu laseru na fotodetektoru se pohybovala trochu přes hodnotu 4, oproti hodnotám přesahujícím 30 při používání normálních sond. Za to může větší vzdálenost duté sondy od fotodetektoru.



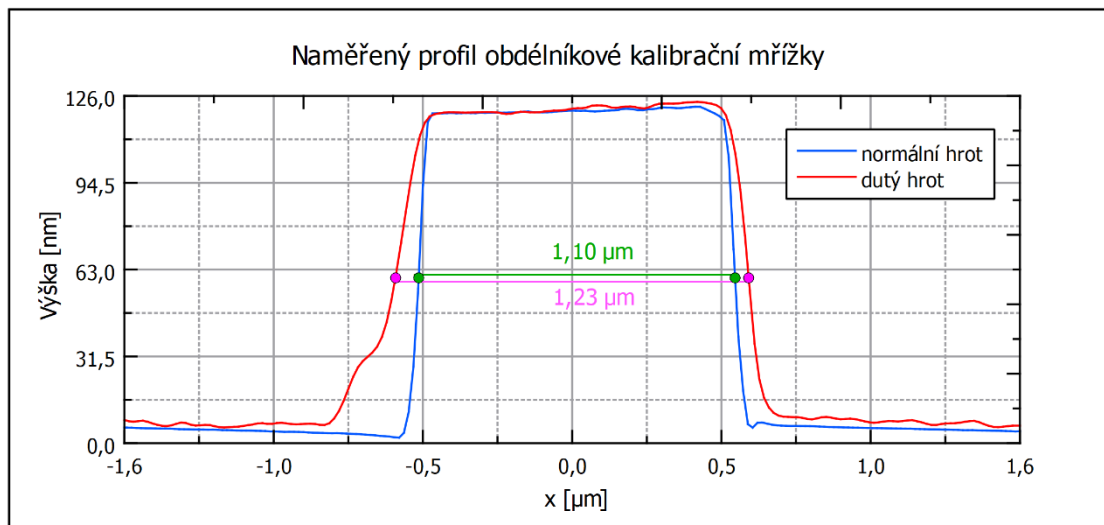
Obr. 5.8

Bylo provedeno měření topografie kalibrační mřížky s profilem obdélníkových schodů v kontaktním režimu zmíněnou sondou Nanopipette za atmosférických podmínek (nejedná se o stejnou kalibrační mřížku jako v části Měření topografie ve vakuu). DFL a LF bylo zkorigováno na nulu a síla signálu laseru činila 4,2. Přiblížení hrotu proběhlo se set pointem

0,5. Byl proveden sken oblasti  $8,5 \mu\text{m} \times 8,5 \mu\text{m}$  s rychlostí  $4 \mu\text{m/s}$ , feedbackem 1 a set pointem 1. Pro porovnání bylo dále provedeno měření stejné kalibrační mřížky v kontaktním režimu sondou od firmy Bruker, jež byly používány při předchozích měřeních. Sken byl prováděn stejnou rychlostí a se stejným rozsahem. Feedback byl nastaven na 1 a set point na 2. Naměřené topografie lze vidět na obrázku. V naměřené topografii lze pozorovat odchylky. Způsobené jsou složitou interakcí dutého hrotu s povrchem. Ten má prakticky čtyři hroty a měřená topografie je konvolucí jejich složité funkce a funkce povrchu mřížky. Částečně mohl měření ještě ovlivnit slabý signál laseru.



Obr. 5.9



Obr. 5.10

## ZÁVĚR

Mikrofluidní měřicí sondy pro mikroskopii atomárních sil zažily největší rozvoj mezi lety 2003 až 2009. Z prvotního zaměření na nanolitografii se rozsah jejich použití rozšířil i na biologické aplikace. Mnoho vyvinutých dutých sond skončilo jen jako prototypy. To ale není případ systému FluidFM od firmy Cytosurge. Ten se stal komerčně úspěšným systémem a podílí se na objevování důležitých poznatků v oblastech biofyziky, mechanobiologie, life sciences a nanotechnologií. FluidFM sice nenabízí takové rozlišení při nanolitografii v atmosférických podmínkách jako jeho předchůdci, ale tuto nevýhodu zastíňuje jeho schopnost práce v kapalném prostředí a regulace směru a velikosti toku tekutiny dutou sondou. Tyto sondy jsou navíc na rozdíl od ostatních dutých sond rozšířené a snadno dostupné. To z nich činí jasnou volbu pro implementaci do AFM sestavy na Ústavu fyzikálního inženýrství fakulty strojního inženýrství VUT.

V rámci bakalářské práce byla implementace prezentována a úspěšně testována při měření topografie kalibrační mřížky v kontaktním režimu AFM dutým hrotem. Dutý hrot má o poznání složitější geometrii než běžné AFM hroty. Vyrobena apertura na špičce hrotu formuje čtyři hroty rozmístěné po jejím obvodu. Naměřený obdélníkový profil kalibrační mřížky se tedy jevil při měření topografie s dutým hrotem širší než při měření s běžným kontaktním hrotem.

Další část práce tvořilo testování a úpravy environmentální komory. Úspěšně byla otestována její schopnost dosáhnout nízkého vakua a optický mikroskop sestavy byl uzpůsoben pro použití s komorou. Pozorovaný relativní posun vzorku a hrotu sondy byl při nasazování a při čerpání atmosféry z komory částečně eliminován, ale pro úplné odstranění jeho vlivu bude nutné v rámci další práce implementovat do sestavy krokové motorčky pro ovládání horizontální pozice vzorku. Pro ovládání prvků AFM mikroskopu i při nasazené komoře byly navrhnuty a vyrobeny funkční koncovky pro manipulátory komory. Takto upravená komora je již plně funkční pro řízení atmosféry v oblasti vzorku. Testovací měření topografie v nízkém vakuu bylo provedeno v kontaktním režimu na kalibrační mřížce. Při měření ve vakuu byl pozorován očekávaný nárůst činitele jakosti sondy, který zajišťuje přesnější měření než v atmosféře. Rozdíly v silové spektroskopii provedené na stejném místě v atmosféře a ve vakuu nemohly být kvůli relativním posunu vzorku a hrotu při vakuování pozorovány.

Funkční implementace dutých sond do AFM sestavy a možnost řídit atmosféru v oblasti hrotu a vzorku otevírá prostor novým experimentům. Předmětem další práce bude přivádět do dutého hrotu plyn a pozorovat jeho vliv na měření. Následně by se mohl plyn elektrickým polem disociovat a provádět lokální oxidaci povrchu. Dalším cílem by mohla být depozice koloidních nanočástic z roztoku.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BINNIG, G., C. QUATE a Ch. GERBER. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* [online]. 1986, **56**(9), 930-933 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0031-9007. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevLett.56.930
- [2] BEHR, Pascal. *FluidFM: Combining AFM with Micro-fluidics for Applications in Lifesciences and Multiparameter Surface Characterization*. Curych, 2015. Dostupné také z: <https://www.research-collection.ethz.ch/handle/20.500.11850/103662>. Dizertační práce. Spolková vysoká technická škola v Curychu.
- [3] CÁHLÍK, Aleš. *Návrh, výroba a testování environmentální komory pro mikroskop atomárních sil a pro elektronická měření nanosenzorů*. Brno, 2014. Bakalářská práce. VUT FSI.
- [4] MEYER, Ernst, Hans HUG a Roland BENNEWITZ. *Scanning Probe Microscopy* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004 [cit. 2022-05-19]. Advanced Texts in Physics. ISBN 978-3-642-07737-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-09801-1
- [5] JOHNSON, Daniel, Nidal HILAL a W. BOWEN. Basic Principles of Atomic Force Microscopy. *Atomic Force Microscopy in Process Engineering* [online]. Elsevier, 2009, s. 1-30 [cit. 2022-05-19]. ISBN 9781856175173. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-85617-517-3.00001-8
- [6] VŮJTEK, Milan, Roman KUBÍNEK a Miroslav MAŠLÁŇ. *Nanoskopie*. 1. vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3102-4.
- [7] VOIGTLÄNDER, Bert. *Atomic Force Microscopy* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019 [cit. 2022-05-19]. NanoScience and Technology. ISBN 978-3-030-13653-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-13654-3
- [8] HAUGSTAD, Greg. *Atomic Force Microscopy: understanding Basic Modes and Advanced Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-0-470-63882-8.
- [9] BINNIG, G. a H. ROHRER. Scanning tunneling microscopy. *Surface Science* [online]. 1983, **126**(1-3), 236-244 [cit. 2022-05-19]. ISSN 00396028. Dostupné z: doi:10.1016/0039-6028(83)90716-1
- [10] ZHONG, Q., D. INNIS, K. KJOLLER a V.B. ELINGS. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science* [online]. 1993, **290**(1-2), 688-692 [cit. 2022-05-19]. ISSN 00396028. Dostupné z: doi:10.1016/0039-6028(93)90582-5
- [11] MEYER, Gerhard a Nabil AMER. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* [online]. 1988, **53**(12), 1045-1047 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.100061
- [12] ERLANDSSON, R., G. MCCLELLAND, C. MATE a S. CHIANG. Atomic force microscopy using optical interferometry. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* [online]. 1988, **6**(2), 266-270 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0734-2101. Dostupné z: doi:10.1116/1.575440
- [13] TORTONESE, M., R. BARRETT a C. QUATE. Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection. *Applied Physics Letters* [online]. 1993, **62**(8), 834-836 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.108593

- [14] EDWARDS, Hal, Larry TAYLOR, Walter DUNCAN a Allan MELMED. Fast, high-resolution atomic force microscopy using a quartz tuning fork as actuator and sensor. *Journal of Applied Physics* [online]. 1997, **82**(3), 980-984 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/1.365936
- [15] RTESPA-300. In: *Bruker* [online]. [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: <https://www.brukerafmprobes.com/p-3907-rtespa-300.aspx>
- [16] GENOLET, G., J. BRUGGER, M. DESPONT, U. DRECHSLER, P. VETTIGER, N. DE ROOIJ a D. ANSELMETTI. Soft, entirely photoplastic probes for scanning force microscopy. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1999, **70**(5), 2398-2401 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1149767
- [17] PILKEY, Walter D. *Formulas for Stress, Strain, and Structural Matrices* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2004 [cit. 2022-05-19]. ISBN 9780470172681. Dostupné z: doi:10.1002/9780470172681
- [18] SADER, John, James CHON a Paul MULVANEY. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1999, **70**(10), 3967-3969 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1150021
- [19] DÜRIG, U., D. POHL a F. ROHNER. Near-field optical-scanning microscopy. *Journal of Applied Physics* [online]. 1986, **59**(10), 3318-3327 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/1.336848
- [20] DVOŘÁK, Petr, Zoltán ÉDES, Michal KVAPIL et al. Imaging of near-field interference patterns by aperture-type SNOM – influence of illumination wavelength and polarization state. *Optics Express* [online]. 2017, **25**(14) [cit. 2022-05-20]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.25.016560
- [21] HANSMA, P., B. DRAKE, O. MARTI, S. GOULD a C. PRATER. The Scanning Ion-Conductance Microscope. *Science* [online]. 1989, **243**(4891), 641-643 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.2464851
- [22] FLORENTLILLE1. Sicm cst z.png. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sicm\\_cst\\_z.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sicm_cst_z.png)
- [23] BARD, Allen, Fu FAN, Juhyouun. KWAK a Ovadia. LEV. Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles. *Analytical Chemistry* [online]. 1989, **61**(2), 132-138 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00177a011
- [24] TAKAHASHI, Yasufumi, Andrew SHEVCHUK, Pavel NOVAK et al. Topographical and electrochemical nanoscale imaging of living cells using voltage-switching mode scanning electrochemical microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2012, **109**(29), 11540-11545 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1203570109
- [25] KUENG, A., C. KRANZ, B. MIZAIKOFF, A. LUGSTEIN a E. BERTAGNOLLI. Combined scanning electrochemical atomic force microscopy for tapping mode imaging. *Applied Physics Letters* [online]. 2003, **82**(10), 1592-1594 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.1559652
- [26] AMEMIYA, Shigeru, Allen BARD, Fu-Ren FAN, Michael MIRKIN a Patrick UNWIN. Scanning Electrochemical Microscopy. *Annual Review of*



- Analytical Chemistry* [online]. 2008, **1**(1), 95-131 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1936-1327. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.anchem.1.031207.112938
- [27] BARBER, M. A. A new method of isolating micro-organisms. *J. Kansas Med. Soc.* **1904**(4), 489–494.
- [28] ZHANG, Shudong, Mingzhi LI, Bin SU a Yuanhua SHAO. Fabrication and Use of Nanopipettes in Chemical Analysis. *Annual Review of Analytical Chemistry* [online]. 2018, **11**(1), 265-286 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1936-1327. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-anchem-061417-125840
- [29] STANLEY, John a Nader POURMAND. Nanopipettes—The past and the present. *APL Materials* [online]. 2020, **8**(10) [cit. 2022-05-19]. ISSN 2166-532X. Dostupné z: doi:10.1063/5.0020011
- [30] MORRIS, Celeste, Alicia FRIEDMAN a Lane BAKER. Applications of nanopipettes in the analytical sciences. *The Analyst* [online]. 2010, **135**(9) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/c0an00156b
- [31] TAKAMI, Tomohide, Bae PARK a Tomoji KAWAI. Nanopipette exploring nanoworld. *Nano Convergence* [online]. 2014, **1**(1) [cit. 2022-05-19]. ISSN 2196-5404. Dostupné z: doi:10.1186/s40580-014-0017-3
- [32] RODOLFA, Kit, Andreas BRUCKBAUER, Dejian ZHOU, Andrew SCHEVCHUK, Yuri KORCHEV a David KLENERMAN. Nanoscale Pipetting for Controlled Chemistry in Small Arrayed Water Droplets Using a Double-Barrel Pipet. *Nano Letters* [online]. 2006, **6**(2), 252-257 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl052215i
- [33] SHALOM, Shmuel, Klony LIEBERMAN, Aaron LEWIS a Sidney COHEN. A micropipette force probe suitable for near-field scanning optical microscopy. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1992, **63**(9), 4061-4065 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1143212
- [34] LIEBERMAN, Klony, Aaron LEWIS, Galina FISH, Shmuel SHALOM, Thomas JOVIN, Achim SCHAPER a Sidney COHEN. Multifunctional, micropipette based force cantilevers for scanned probe microscopy. *Applied Physics Letters* [online]. 1994, **65**(5), 648-650 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.112259
- [35] LEWIS, Aaron, Yuri KHEIFETZ, Efim SHAMBRODT, Anna RADKO, Edward KHATCHATRYAN a Chaim SUKENIK. Fountain pen nanochemistry: Atomic force control of chrome etching. *Applied Physics Letters* [online]. 1999, **75**(17), 2689-2691 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.125120
- [36] HONG, Mun-Heon, Ki KIM, Joonho BAE a Wonho JHE. Scanning nanolithography using a material-filled nanopipette. *Applied Physics Letters* [online]. 2000, **77**(16), 2604-2606 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.1319181
- [37] TAHA, Hesham, Robert MARKS, Levi GHEBER, Ittay ROUSSO, John NEWMAN, Chaim SUKENIK a Aaron LEWIS. Protein printing with an atomic force sensing nanofountainpen. *Applied Physics Letters* [online]. 2003, **83**(5), 1041-1043 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.1594844
- [38] ITO, So, Takuya KEINO a Futoshi IWATA. Volume Control of Metal-Plating Deposition Using a Nanopipette Probe by Controlling Electric Charge.

- Japanese Journal of Applied Physics* [online]. 2010, **49**(8) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0021-4922. Dostupné z: doi:10.1143/JJAP.49.08LB16
- [39] ITO, So a Futoshi IWATA. Nanometer-Scale Deposition of Metal Plating Using a Nanopipette Probe in Liquid Condition. *Japanese Journal of Applied Physics* [online]. 2011, **50**(8) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0021-4922. Dostupné z: doi:10.1143/JJAP.50.08LB15
- [40] JASCHKE, Manfred a Hans-Juergen BUTT. Deposition of Organic Material by the Tip of a Scanning Force Microscope. *Langmuir* [online]. 1995, **11**(4), 1061-1064 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la00004a004
- [41] PINER, Richard, Jin ZHU, Feng XU, Seunghun HONG a Chad MIRKIN. "Dip-Pen" Nanolithography. *Science* [online]. 1999, **283**(5402), 661-663 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.283.5402.661
- [42] SALAITA, Khalid, Yuhuang WANG a Chad MIRKIN. Applications of dip-pen nanolithography. *Nature Nanotechnology* [online]. 2007, **2**(3), 145-155 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1748-3387. Dostupné z: doi:10.1038/nnano.2007.39
- [43] HONG, Seunghun, Jin ZHU a Chad MIRKIN. Multiple Ink Nanolithography: Toward a Multiple-Pen Nano-Plotter. *Science* [online]. 1999, **286**(5439), 523-525 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.286.5439.523
- [44] HONG, Seunghun a Chad MIRKIN. A Nanoplotter with Both Parallel and Serial Writing Capabilities. *Science* [online]. 2000, **288**(5472), 1808-1811 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.288.5472.1808
- [45] MEISTER, A., S. JENEY, M. LILEY, T. AKIYAMA, U. STAUFER, N.F. DE ROOIJ a H. HEINZELMANN. Nanoscale dispensing of liquids through cantilevered probes. *Microelectronic Engineering* [online]. 2003, **67-68**, 644-650 [cit. 2022-05-19]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-9317(03)00126-6
- [46] MEISTER, A., M. LILEY, J. BRUGGER, R. PUGIN a H. HEINZELMANN. Nanodispenser for attoliter volume deposition using atomic force microscopy probes modified by focused-ion-beam milling. *Applied Physics Letters* [online]. 2004, **85**(25), 6260-6262 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.1842352
- [47] KAISEI, Kiyohiro, Nobuo SATOH, Kei KOBAYASHI, Kazumi MATSUSHIGE a Hirofumi YAMADA. Nanoscale liquid droplet deposition using the ultrasmall aperture on a dynamic mode AFM tip. *Nanotechnology* [online]. 2011, **22**(17) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/22/17/175301
- [48] MEISTER, André, Sivashankar KRISHNAMOORTHY, Christian HINDERLING, Raphaël PUGIN a Harry HEINZELMANN. Local modification of micellar layers using nanoscale dispensing. *Microelectronic Engineering* [online]. 2006, **83**(4-9), 1509-1512 [cit. 2022-05-19]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2006.01.207
- [49] KIM, K.-H., C KE, N. MOLDOVAN a H.D. ESPINOSA. Massively parallel multi-tip nanoscale writer with fluidic capabilities-fountain pen nanolithography (FPN). *Proc. 4th Int. Symp. on MEMS and Nanotechnology*. [online]. 2003, 235-238 [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/254307368\\_Massively\\_parallel\\_multi-](https://www.researchgate.net/publication/254307368_Massively_parallel_multi-)

tip\_nanoscale\_writer\_with\_fluidic\_capabilities-  
fountain\_pen\_nanolithography\_FPN

- [50] DELADI, S., N. TAS, J. BERENSCHOT, G. KRIJNEN, M. DE BOER, J. DE BOER, M. PETER a M. ELWENSPOEK. Micromachined fountain pen for atomic force microscope-based nanopatterning. *Applied Physics Letters* [online]. 2004, **85**(22), 5361-5363 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.1823040
- [51] WENSINK, Henk, Stefan SCHLAUTMANN, Martijn GOEDBLOED a Miko ELWENSPOEK. Fine tuning the roughness of powder blasted surfaces. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2002, **12**(5), 616-620 [cit. 2022-05-19]. ISSN 09601317. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/12/5/316
- [52] YUNG-HSUN SHIH, , YUNG-KANG SHEN, YI LIN, KENG-LIANG OU, RONG-HONG HONG a SUNG-CHIH HSU. Microfluidic chip fabrication by micro-powder blasting. In: *2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* [online]. IEEE, 2008, s. 780-783 [cit. 2022-05-19]. ISBN 978-1-4244-1907-4. Dostupné z: doi:10.1109/NEMS.2008.4484442
- [53] KIM, Keun-Ho, Nicolaie MOLDOVAN a Horacio D. ESPINOSA. A Nanofountain Probe with Sub-100 nm Molecular Writing Resolution. *Small* [online]. 2005, **1**(6), 632-635 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1613-6810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.200500027
- [54] MOLDOVAN, N., K.-H. KIM a H.D. ESPINOSA. Design and Fabrication of a Novel Microfluidic Nanoprobe. *Journal of Microelectromechanical Systems* [online]. 2006, **15**(1), 204-213 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1057-7157. Dostupné z: doi:10.1109/JMEMS.2005.863701
- [55] LOH, Owen, Andrea HO, Jee RIM, Punit KOHLI, Neelesh PATANKAR a Horacio ESPINOSA. Electric field-induced direct delivery of proteins by a nanofountain probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(43), 16438-16443 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0806651105
- [56] LOH, Owen, Robert LAM, Mark CHEN, Nicolaie MOLDOVAN, Houjin HUANG, Dean HO a Horacio ESPINOSA. Nanofountain-Probe-Based High-Resolution Patterning and Single-Cell Injection of Functionalized Nanodiamonds. *Small* [online]. 2009, **5**(14), 1667-1674 [cit. 2022-05-19]. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.200900361
- [57] MEISTER, A., J. PRZYBYLSKA, P. NIEDERMANN, C. SANTSCHI a H. HEINZELMANN. *Hollow Atomic Force Microscopy Probes for Nanoscale Dispensing of Liquids*. [online]. 2008 [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Hollow-Atomic-Force-Microscopy-Probes-for-Nanoscale-Meister-Przybylska/52b24e6a5451becbfc2db89c34fc9d7e241fe94>
- [58] HUG, T.S., T. BISS, N.F. DE ROOIJ a U. STAUFER. Generic fabrication technology for transparent and suspended microfluidic and nanofluidic channels. In: *The 13th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 2005. Digest of Technical Papers. TRANSDUCERS '05* [online]. IEEE, 2005, s. 1191-1194 [cit. 2022-05-19]. ISBN 0-7803-8994-8. Dostupné z: doi:10.1109/SENSOR.2005.1497291

- [59] MEISTER, André, Jérôme POLESEL-MARIS, Philippe NIEDERMANN et al. Nanoscale dispensing in liquid environment of streptavidin on a biotin-functionalized surface using hollow atomic force microscopy probes. *Microelectronic Engineering* [online]. 2009, **86**(4-6), 1481-1484 [cit. 2022-05-19]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2008.10.025
- [60] POLESEL, Jarome, Harry HEINZELMANN, André MEISTER et al. A Novel AFM-based Tool for Dispensing Fluids into Single Cells. *Microscopy and Analysis* [online]. 2009, **23**(6), 11-13 [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/262099026\\_NADIS\\_A\\_Novel\\_AFM-based\\_Tool\\_for\\_Dispensing\\_Fluids\\_into\\_Single\\_Cells](https://www.researchgate.net/publication/262099026_NADIS_A_Novel_AFM-based_Tool_for_Dispensing_Fluids_into_Single_Cells)
- [61] MEISTER, André, Michael GABI, Pascal BEHR et al. FluidFM: Combining Atomic Force Microscopy and Nanofluidics in a Universal Liquid Delivery System for Single Cell Applications and Beyond. *Nano Letters* [online]. 2009, **9**(6), 2501-2507 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl901384x
- [62] Cytosurge FluidFM Function. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.3pnr.com/wp-content/uploads/2016/01/Cytosurge-FluidFM-Function.png>
- [63] BERENSCHOT, Erwin, Narges BUROUNI, Bart SCHURINK et al. 3D Nanofabrication of Fluidic Components by Corner Lithography. *Small* [online]. 2012, **8**(24), 3823-3831 [cit. 2022-05-19]. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201201446
- [64] ZAMBELLI, Tomaso, Mathias J. AEBERSOLD, Pascal BEHR, Hana HAN, Luca HIRT, Vincent MARTINEZ, Orane GUILLAUME-GENTIL a János VÖRÖS. FluidFM: Development of the Instrument as well as Its Applications for 2D and 3D Lithography. DELAMARCHE, Emmanuel a Govind KAIGALA. *Open-Space Microfluidics: Concepts, Implementations, Applications* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2018, s. 295-323 [cit. 2022-05-19]. ISBN 9783527696789. Dostupné z: doi:10.1002/9783527696789.ch14
- [65] FluidFM Nanopipette. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/shop/product/fluidfm-nanopipette-340#attr=109,66,237>
- [66] DÖRIG, Stefan Pablo. *Manipulating cells and colloids with fluidFM*. Curych, 2013. Dizertační práce. Spolková vysoká technická škola v Curychu.
- [67] MARTINEZ, Vincent, Pascal BEHR, Ute DRECHSLER, Jérôme POLESEL-MARIS, Eva POTTHOFF, Janos VÖRÖS a Tomaso ZAMBELLI. SU-8 hollow cantilevers for AFM cell adhesion studies. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2016, **26**(5) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0960-1317. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/26/5/055006
- [68] HAN, Hana, Vincent MARTINEZ, Mathias AEBERSOLD, Ines LÜCHTEFELD, Jérôme POLESEL-MARIS, János VÖRÖS a Tomaso ZAMBELLI. Force controlled SU-8 micropipettes fabricated with a sideways process. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2018, **28**(9) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0960-1317. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6439/aac83c
- [69] GAITAS, Angelo a Robert HOWER. SU-8 microcantilever with an aperture, fluidic channel, and sensing mechanisms for biological and other applications.

- Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS* [online]. 2014, **13**(3) [cit. 2022-05-19]. ISSN 1932-5150. Dostupné z: doi:10.1117/1.JMM.13.3.030501
- [70] HAN, Hana, Vincent MARTINEZ, Csaba FORRÓ, Jérôme POLESELMARIS, János VÖRÖS a Tomaso ZAMBELLI. Integration of silver nanowires into SU-8 hollow cantilevers for piezoresistive-based sensing. *Sensors and Actuators A: Physical* [online]. 2020, **301** [cit. 2022-05-19]. ISSN 09244247. Dostupné z: doi:10.1016/j.sna.2019.111748
- [71] KRAMER, Robert, Eleonor VERLINDEN, Livia ANGELONI, Anita VAN DEN HEUVEL, Lidy FRATILA-APACHITEI, Silvère VAN DER MAAREL a Murali GHATKESAR. Multiscale 3D-printing of microfluidic AFM cantilevers. *Lab on a Chip* [online]. 2020, **20**(2), 311-319 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C9LC00668K
- [72] HUG, Thomas, Nicolas ROOIJ a U. STAUFER. Fabrication and electroosmotic flow measurements in micro- and nanofluidic channels. *Microfluidics and Nanofluidics* [online]. 2006, **2**(2), 117-124 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1613-4982. Dostupné z: doi:10.1007/s10404-005-0051-x
- [73] HEUCK, F., T. HUG, T. AKIYAMA et al. Evaporation based micro pump integrated into a scanning force microscope probe. *Microelectronic Engineering* [online]. 2008, **85**(5-6), 1302-1305 [cit. 2022-05-19]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2007.12.047
- [74] GHATKESAR, Murali, Hector GARZA a Urs STAUFER. Hollow AFM cantilever pipette. *Microelectronic Engineering* [online]. 2014, **124**, 22-25 [cit. 2022-05-19]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2014.04.019
- [75] WOLF, J. *Robust SPM Probe Tracking*. Curych, 2013. Diplomová práce. Spolková vysoká technická škola v Curychu.
- [76] GRÜTER, Raphael, János VÖRÖS a Tomaso ZAMBELLI. FluidFM as a lithography tool in liquid: spatially controlled deposition of fluorescent nanoparticles. *Nanoscale* [online]. 2013, **5**(3), 1097-1104 [cit. 2022-05-19]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/C2NR33214K
- [77] GRÜTER, Robert, Bernd DIELACHER, Luca HIRT, János VÖRÖS a Tomaso ZAMBELLI. Patterning gold nanoparticles in liquid environment with high ionic strength for local fabrication of up to 100  $\mu$  m long metallic interconnections. *Nanotechnology* [online]. 2015, **26**(17) [cit. 2022-05-19]. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/26/17/175301
- [78] VENTRICI DE SOUZA, Joao, Yang LIU, Shuo WANG, Pablo DÖRIG, Tonya KUHL, Jane FROMMER a Gang-yu LIU. Three-Dimensional Nanoprinting via Direct Delivery. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2018, **122**(2), 956-962 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.7b06978
- [79] ZHANG, Jiali, Victoria PIUNOVA, Yang LIU, Andy TEK, Qingbo YANG, Jane FROMMER, Gang-yu LIU a Joseph SLY. Controlled Molecular Assembly via Dynamic Confinement of Solvent. *The Journal of Physical Chemistry Letters* [online]. 2018, **9**(21), 6232-6237 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1948-7185. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpclett.8b02442
- [80] ZHANG, Jiali, Hai YU, Bradley HARRIS et al. New Means to Control Molecular Assembly. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2020, **124**(11), 6405-6412 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.9b11377

- [81] WANG, Shuo, Shuang LIU, Audrey SULKANEN, Joseph FOX, Xinqiao JIA a Gang-yu LIU. Controlled Molecular Assembly of Tetrazine Derivatives on Surfaces. *CCS Chemistry* [online]. 2022, **4**(1), 162-172 [cit. 2022-05-19]. ISSN 2096-5745. Dostupné z: doi:10.31635/ccschem.021.202101088
- [82] AEBERSOLD, Mathias, Harald DERMUTZ, László DEMKÓ et al. Local Chemical Stimulation of Neurons with the Fluidic Force Microscope (FluidFM). *ChemPhysChem* [online]. 2018, **19**(10), 1234-1244 [cit. 2022-05-19]. ISSN 14394235. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.201700780
- [83] HELFRICHT, Nicolas, Andreas MARK, Marina BEHR, Andreas BERNET, Hans-Werner SCHMIDT a Georg PAPASTAVROU. Writing with Fluid: Structuring Hydrogels with Micrometer Precision by AFM in Combination with Nanofluidics. *Small* [online]. 2017, **13**(31) [cit. 2022-05-19]. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/smll.201700962
- [84] Print any pattern at sub-micrometer resolution with FluidFM® systems. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/applications/nanoprinting>
- [85] GUILLAUME-GENTIL, Orane, Eva POTTHOFF, Dario OSSOLA, Pablo DÖRIG, Tomaso ZAMBELLI a Julia VORHOLT. Force-Controlled Fluidic Injection into Single Cell Nuclei. *Small* [online]. 2013, **9**(11), 1904-1907 [cit. 2022-05-19]. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/smll.201202276
- [86] GUILLAUME-GENTIL, Orane, Rashel GRINDBERG, Romain KOOPER et al. Tunable Single-Cell Extraction for Molecular Analyses. *Cell* [online]. 2016, **166**(2), 506-516 [cit. 2022-05-19]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.06.025
- [87] GUILLAUME-GENTIL, Orane, Timo REY, Patrick KIEFER et al. Single-Cell Mass Spectrometry of Metabolites Extracted from Live Cells by Fluidic Force Microscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2017, **89**(9), 5017-5023 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b00367
- [88] GUILLAUME-GENTIL, Orane, Christoph GÄBELEIN, Stefanie SCHMIEDER, Vincent MARTINEZ, Tomaso ZAMBELLI, Markus KÜNZLER a Julia VORHOLT. Injection into and extraction from single fungal cells. *Communications Biology* [online]. 2022, **5**(1) [cit. 2022-05-19]. ISSN 2399-3642. Dostupné z: doi:10.1038/s42003-022-03127-z
- [89] HIGGINS, Stuart a Molly STEVENS. Extracting the contents of living cells. *Science* [online]. 2017, **356**(6336), 379-380 [cit. 2022-05-19]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aan0228
- [90] STIEFEL, Philipp, Florian SCHMIDT, Pablo DÖRIG, Pascal BEHR, Tomaso ZAMBELLI, Julia VORHOLT a Jason MERCER. Cooperative Vaccinia Infection Demonstrated at the Single-Cell Level Using FluidFM. *Nano Letters* [online]. 2012, **12**(8), 4219-4227 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl3018109
- [91] LI, Mi, Dan DANG, Lianqing LIU, Ning XI a Yuechao WANG. Atomic Force Microscopy in Characterizing Cell Mechanics for Biomedical Applications: A Review. *IEEE Transactions on NanoBioscience* [online]. 2017, **16**(6), 523-540 [cit. 2022-05-20]. ISSN 1536-1241. Dostupné z: doi:10.1109/TNB.2017.2714462
- [92] Single cell omics with FluidFM®. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/applications/single-cell-omics>

- [93] Speed up single-cell adhesion measurements with FluidFM® systems. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/applications/mechanobiology>
- [94] GUILLAUME-GENTIL, Orane, Tomaso ZAMBELLI a Julia VORHOLT. Isolation of single mammalian cells from adherent cultures by fluidic force microscopy. *Lab Chip* [online]. 2014, **14**(2), 402-414 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C3LC51174J
- [95] MARTINEZ, Vincent, Csaba FORRÓ, Serge WEYDERT et al. Controlled single-cell deposition and patterning by highly flexible hollow cantilevers. *Lab on a Chip* [online]. 2016, **16**(9), 1663-1674 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C5LC01466B
- [96] POTTHOFF, Eva, Orane GUILLAUME-GENTIL, Dario OSSOLA, Jérôme POLESEL-MARIS, Salomé LEIBUNDGUT-LANDMANN, Tomaso ZAMBELLI, Julia VORHOLT a Etienne DAGUE. Rapid and Serial Quantification of Adhesion Forces of Yeast and Mammalian Cells. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(12) [cit. 2022-05-19]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0052712
- [97] POTTHOFF, Eva, Davide FRANCO, Valentina D'ALESSANDRO et al. Toward a Rational Design of Surface Textures Promoting Endothelialization. *Nano Letters* [online]. 2014, **14**(2), 1069-1079 [cit. 2022-05-19]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl4047398
- [98] MCGRATH, John, Jos QUIST, James SEDDON, Stanley LAI, Serge LEMAY, Helen BRIDLE a Etienne DAGUE. Deformability Assessment of Waterborne Protozoa Using a Microfluidic-Enabled Force Microscopy Probe. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(3) [cit. 2022-05-19]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0150438
- [99] SANKARAN, Shrikrishnan, Leena JAATINEN, Jenny BRINKMANN, Tomaso ZAMBELLI, Janos VÖRÖS a Pascal JONKHEIJM. Cell Adhesion on Dynamic Supramolecular Surfaces Probed by Fluid Force Microscopy-Based Single-Cell Force Spectroscopy. *ACS Nano* [online]. 2017, **11**(4), 3867-3874 [cit. 2022-05-20]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.7b00161
- [100] SPRECHER, Kathrin, Isabelle HUG, Jutta NESPER et al. Cohesive Properties of the *Caulobacter crescentus* Holdfast Adhesin Are Regulated by a Novel c-di-GMP Effector Protein. *MBio* [online]. 2017, **8**(2), 00294-17 [cit. 2022-05-20]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.00294-17
- [101] DEHULLU, Jérôme, Julia VORHOLT, Peter LIPKE a Yves DUFRÊNE. Fluidic Force Microscopy Captures Amyloid Bonds between Microbial Cells. *Trends in Microbiology* [online]. 2019, **27**(9), 728-730 [cit. 2022-05-20]. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2019.06.001
- [102] MITTELVIEFHAUS, Maximilian, Daniel MÜLLER, Tomaso ZAMBELLI a Julia VORHOLT. A modular atomic force microscopy approach reveals a large range of hydrophobic adhesion forces among bacterial members of the leaf microbiota. *The ISME Journal* [online]. 2019, **13**(7), 1878-1882 [cit. 2022-05-20]. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/s41396-019-0404-1
- [103] HOFHERR, Linda, Christine MÜLLER-RENNO, Christiane ZIEGLER a Kerstin BLANK. FluidFM as a tool to study adhesion forces of bacteria - Optimization of parameters and comparison to conventional bacterial probe

- Scanning Force Spectroscopy. *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(7) [cit. 2022-05-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0227395
- [104] LI, Q.S., G.Y.H. LEE, C.N. ONG a C.T. LIM. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2008, **374**(4), 609-613 [cit. 2022-05-20]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.078
- [105] RODER, Phillip, Carsten HILLE a Dimitrios FOTIADIS. A Multifunctional Frontloading Approach for Repeated Recycling of a Pressure-Controlled AFM Micropipette. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(12) [cit. 2022-05-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0144157
- [106] OSSOLA, Dario, Livie DORWLING-CARTER, Harald DER MUTZ, Pascal BEHR, János VÖRÖS a Tomaso ZAMBELLI. Simultaneous Scanning Ion Conductance Microscopy and Atomic Force Microscopy with Microchanneled Cantilevers. *Physical Review Letters* [online]. 2015, **115**(23) [cit. 2022-05-20]. ISSN 0031-9007. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevLett.115.238103
- [107] ARAMESH, Morteza, Csaba FORRÓ, Livie DORWLING-CARTER et al. Localized detection of ions and biomolecules with a force-controlled scanning nanopore microscope. *Nature Nanotechnology* [online]. 2019, **14**(8), 791-798 [cit. 2022-05-20]. ISSN 1748-3387. Dostupné z: doi:10.1038/s41565-019-0493-z
- [108] OSSOLA, Dario, Mohamed-Yassine AMAROUCH, Pascal BEHR, János VÖRÖS, Hugues ABRIEL a Tomaso ZAMBELLI. Force-Controlled Patch Clamp of Beating Cardiac Cells. *Nano Letters* [online]. 2015, **15**(3), 1743-1750 [cit. 2022-05-20]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl504438z
- [109] HIRT, Luca, Raphael GRÜTER, Thomas BERTHELOT, Renaud CORNUT, János VÖRÖS a Tomaso ZAMBELLI. Local surface modification via confined electrochemical deposition with FluidFM. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(103), 84517-84522 [cit. 2022-05-20]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA07239E
- [110] HIRT, Luca, Stephan IHLE, Zhijian PAN et al. Template-Free 3D Microprinting of Metals Using a Force-Controlled Nanopipette for Layer-by-Layer Electrodeposition. *Advanced Materials* [online]. 2016, **28**(12), 2311-2315 [cit. 2022-05-20]. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201504967
- [111] ERCOLANO, Giorgio, Tomaso ZAMBELLI, Cathelijn VAN NISSELROY, Dmitry MOMOTENKO, János VÖRÖS, Thibaut MERLE a Wabe KOELMANS. Multiscale Additive Manufacturing of Metal Microstructures. *Advanced Engineering Materials* [online]. 2020, **22**(2) [cit. 2022-05-20]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.201900961
- [112] VAN NISSELROY, Cathelijn, Chunjian SHEN, Tomaso ZAMBELLI a Dmitry MOMOTENKO. Electrochemical 3D printing of silver and nickel microstructures with FluidFM. *Additive Manufacturing* [online]. 2022, **53** [cit. 2022-05-20]. ISSN 22148604. Dostupné z: doi:10.1016/j.addma.2022.102718
- [113] FOR INNOVATORS & VISIONARIES IN MICROMANUFACTURING. In: *Exaddon* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.exaddon.com/about-exaddon>
- [114] FluidFM Probes. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/shop/category/fluidfm-probes-1>
- [115] FluidFM® OMNIUM. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/solutions/systems/fluidfm-omnium>



- [116] FluidFM® ADD-ON. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/solutions/systems/fluidfm-add-on>
- [117] FluidFM® systems. In: *Cytosurge* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.cytosurge.com/solutions/systems>
- [118] CERES ULTRA-PRECISE PRINTING SYSTEM. In: *Exaddon* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://www.exaddon.com/product>
- [119] PEREZ GARZA, Hector, Murali GHATKESAR a Urs STAUFER. Combined AFM—nanopipette cartridge system for actively dispensing femtolitre droplets. *Journal of Micro-Bio Robotics* [online]. 2013, **8**(1), 33-40 [cit. 2022-05-20]. ISSN 2194-6418. Dostupné z: doi:10.1007/s12213-013-0064-6
- [120] VAN OORSCHOT, Ralph, Hector PEREZ GARZA, Roy DERKS, Urs STAUFER a Murali GHATKESAR. A microfluidic AFM cantilever based dispensing and aspiration platform. *EPJ Techniques and Instrumentation* [online]. 2015, **2**(1) [cit. 2022-05-20]. ISSN 2195-7045. Dostupné z: doi:10.1140/epjti/s40485-014-0012-4
- [121] PEREZ GARZA, Hector, Murali GHATKESAR, Per LOTHMAN, Andreas MANZ a Urs STAUFER. Enabling local deposition and controlled synthesis of Au-nanoparticles using a femtopipette. In: *The 9th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS)* [online]. IEEE, 2014, s. 323-328 [cit. 2022-05-20]. ISBN 978-1-4799-4726-3. Dostupné z: doi:10.1109/NEMS.2014.6908818
- [122] GARZA, Héctor, Murali GHATKESAR, Shibabrata BASAK, Per LÖTHMAN a Urs STAUFER. Nano-Workbench: A Combined Hollow AFM Cantilever and Robotic Manipulator. *Micromachines* [online]. 2015, **6**(5), 600-610 [cit. 2022-05-20]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi6050600
- [123] KATO, Norihisa, Takahiro KAWASHIMA, Takayuki SHIBATA, Takashi MINETA a Eiji MAKINO. Micromachining of a newly designed AFM probe integrated with hollow microneedle for cellular function analysis. *Microelectronic Engineering* [online]. 2010, **87**(5-8), 1185-1189 [cit. 2022-05-20]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2009.12.025
- [124] ZAHN, Jeffrey, Neil TALBOT, Dorian LIEPMANN a Albert PISANO. Microfabricated Polysilicon Microneedles for Minimally Invasive Biomedical Devices. *Biomedical Microdevices* [online]. 2000, **2**(4), 295-303 [cit. 2022-05-20]. ISSN 13872176. Dostupné z: doi:10.1023/A:1009907306184
- [125] SHIBATA, T., A. NAKANISHI, T. SAKAI, N. KATO, T. KAWASHIMA, T. MINETA a E. MAKINO. Fabrication and mechanical characterization of microneedle array for cell surgery. *Proc. 14th Int. Conf. on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers'07)* [online]. 2007, 719-722 [cit. 2022-05-20].
- [126] KAWASHIMA, Takahiro. Mechanical characterization and insertion performance of hollow microneedle array for cell surgery. *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS* [online]. 2009, **8**(3) [cit. 2022-05-20]. ISSN 1932-5150. Dostupné z: doi:10.1117/1.3206971
- [127] KATO, Norihisa, Takayuki SHIBATA, Ryotaro OKA, Takahiro SAKAI, Takahiro KAWASHIMA, Mitsuyoshi NOMURA, Takashi MINETA a Eiji MAKINO. EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL ANALYSIS OF MICROFLUID EJECTION PROCESS USING MICRONEEDLE FOR CELL

- SURGERY. *Thirteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* [online]. 2009 [cit. 2022-05-20].
- [128] SHIBATA, Takayuki, Kenji NAKAMURA, Shuhei HORIIKE, Moeto NAGAI, Takahiro KAWASHIMA, Takashi MINETA a Eiji MAKINO. Fabrication and characterization of bioprobe integrated with a hollow nanoneedle for novel AFM applications in cellular function analysis. *Microelectronic Engineering* [online]. 2013, **111**, 325-331 [cit. 2022-05-20]. ISSN 01679317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2013.02.051
- [129] NTEGRA AURA. In: *NT-MDT* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://ntmdt.nl/home/products/ntegra-aura/>
- [130] Products. In: *NT-MDT* [online]. [cit. 2022-05-20]. Dostupné z: <https://ntmdt.nl/home/products/>
- [131] KOSTKA, Marek. *Detekce UV záření pomocí Grafen/GaN struktur*. Brno, 2021. Bakalářská práce. VUT FSI.