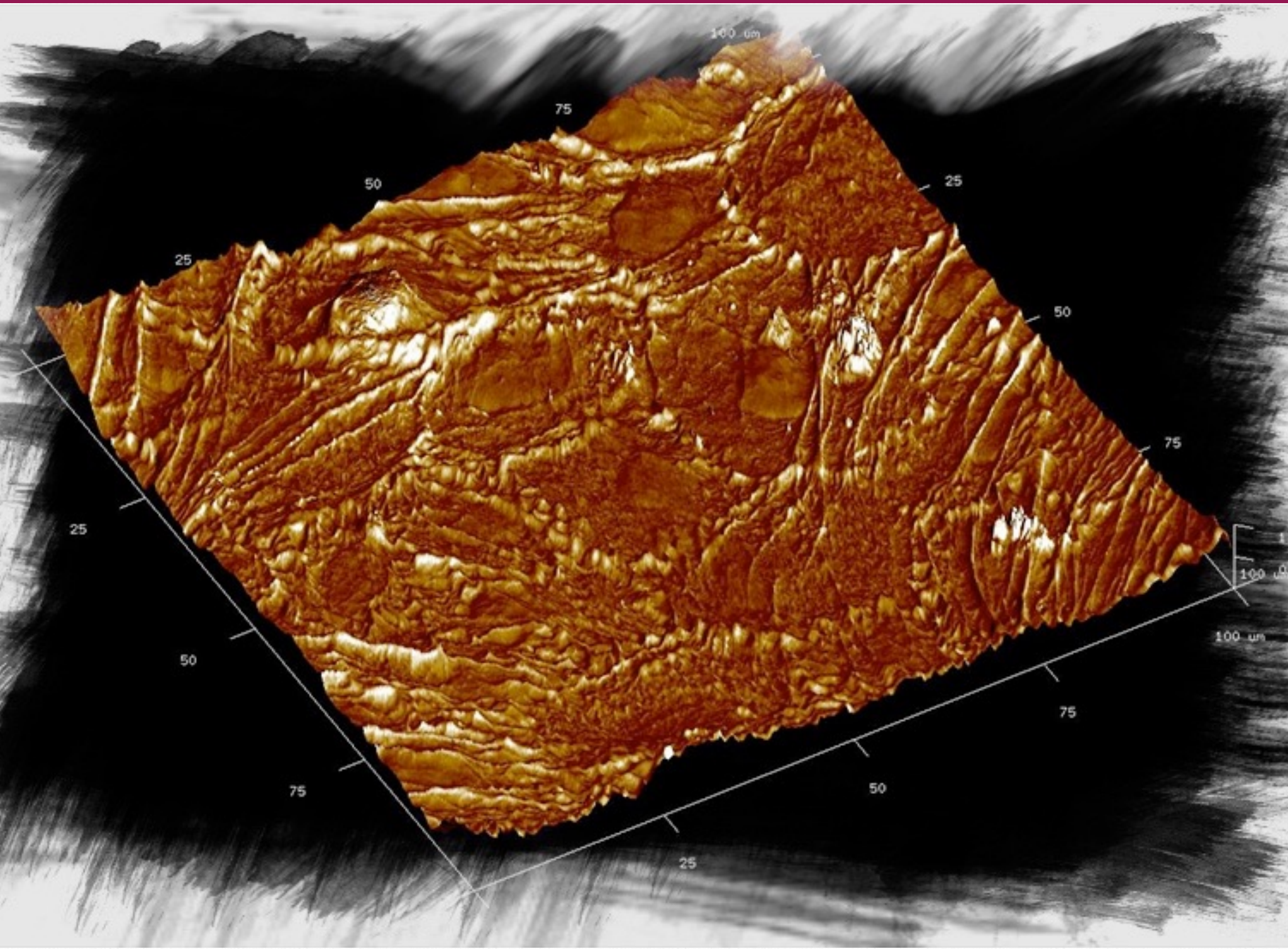


10

Mikroskopia sił atomowych (AFM)

dr Michał Sarna (michal.sarna@uj.edu.pl)



Wprowadzenie

Mikroskop sił atomowych (AFM, *ang. Atomic Force Microscope*) nazywany również skaningowym mikroskopem sił (SFM, *ang. Scanning Force Microscope*) [1] jest jednym z najbardziej uniwersalnych przedstawicieli szerokiej grupy mikroskopów ze skanującą sondą (SPM, *ang. Scanning Probe Microscopy*) [2]. Pierwszym przedstawicielem tej rodziny mikroskopów był zaprezentowany w 1982 r. przez Binniga i Rohrera skaningowy mikroskop tunelowy (STM, *ang. Scanning Tunneling Microscope*) [3]. Działanie mikroskopu STM opiera się na jednym z najbardziej fundamentalnych zjawisk mechaniki kwantowej, a mianowicie na efekcie tunelowania elektronów pomiędzy sondą a badaną próbką. Za to odkrycie obaj badacze zostali uhonorowani w 1986 r. nagrodą Nobla z fizyki. W tym samym roku Binnig i współpracownicy zaprezentowali mikroskop sił atomowych, który obecnie należy do najczęściej stosowanych narzędzi szeroko pojmowanej nanotechnologii.

Zasada działania

W przeciwieństwie do mikroskopów optycznych, które “obserwują” próbkę z pewnej odległości, wykorzystując do tego światło i układy soczewek, mikroskopy

SPM “wyczuwają” próbkę za pomocą sondy, która będąc w bliskiej odległości od powierzchni próbki mierzy wybrane oddziaływanie pomiędzy sondą a badaną próbką. Z tym mechanizmem działania związana jest inna nazwa mikroskopii SPM, która jest często spotykana w literaturze, mianowicie mikroskopia bliskiego pola (*ang. near-field microscopy*). Rysunek 10.1 przedstawia porównanie zasady działania mikroskopu optycznego oraz mikroskopu AFM, wykorzystując analogię do sposobu działania dwóch podstawowych zmysłów jakimi są wzrok oraz dotyk na przykładzie wizyty w muzeum.

Zwykle osoba zwiedzająca muzeum ogląda obrazy oraz inne eksponaty przy pomocy wzroku, znajdując się w pewnej odległości od nich. Istnieją jednak muzea, w których zwiedzający ma zawiązane oczy. Wymaga to użycia innego zmysłu mianowicie dotyku. Mogłoby się wydawać, że dotyk będzie znacznie mniej dokładny aniżeli wzrok ale jest to tylko złudzenie ponieważ nie jesteśmy przyzwyczajeni do „wyczuwania” otaczającego nas świata. To prawda, że w skali makroskopowej wzrok sprawdza się doskonale i mało kto zamieniłby wzrok na dotyk ale w skali „mikro” a jeszcze bardziej „nano”, wzrok jest bezużyteczny

Rysunek 10.1 Porównanie pracy mikroskopu optycznego i mikroskopu AFM w oparciu o analogię do zmysłów wzroku oraz dotyku.



ze względu na falową naturę światła i związane z tym zjawiska fizyczne, które skutecznie ograniczają zdolność rozdzielczą nawet najlepszego „oka”. Dlatego niektóre bardzo małe zwierzęta posiadają specjalne czułki, którymi wyczuwają otaczające je przedmioty, gdyż ów dotyk nie jest ograniczony zjawiskiem dyfrakcji a jedynie fizycznym rozmiarem obszaru oddziaływania. Jako ciekawostkę warto przypomnieć, że pierwszym mikroskopem, wykorzystującym światło, który „obszedł” zjawisko dyfrakcji był jeden z przedstawicieli mikroskopów SPM a mianowicie skaningowy mikroskop optyczny bliskiego pola (SNOM, *ang. Scanning Near-field Optical Microscope*) [4]. Mikroskop ten wyposażony jest w specjalną sondę zakończoną bardzo małym otworem rzędu kilkudziesięciu nanometrów przez który wydostające światło „nie zdąży” ulec

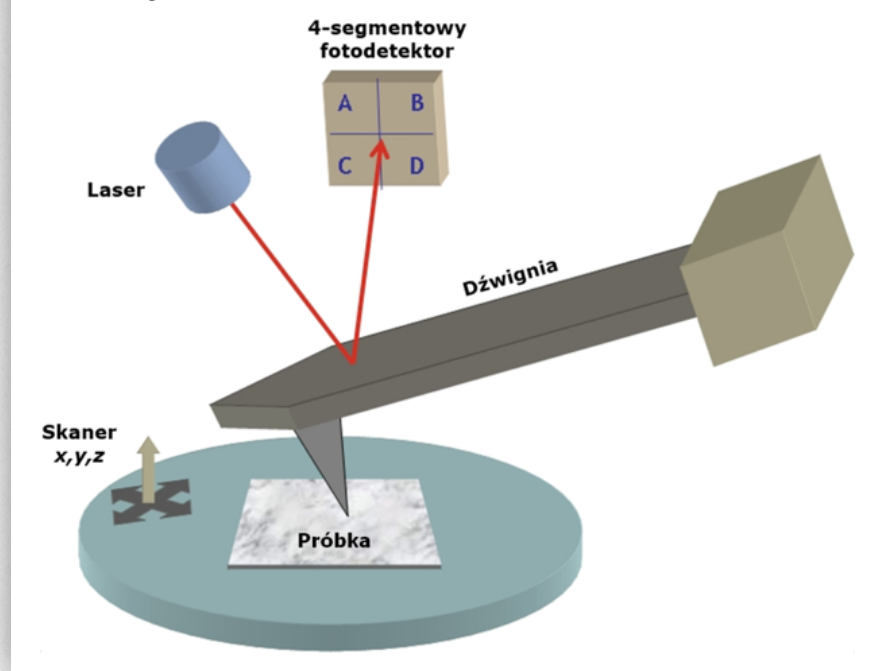
dyfrakcji ze względu na zbyt mały dystans pomiędzy sondą a badaną próbką. Niestety z powodu wielu ograniczeń technicznych, wynikających głównie z zasady działania, mikroskop ten nie znalazł szerokiego zastosowania w biologii.

Budowa mikroskopu AFM

Podstawą konstrukcyjną mikroskopu sił atomowych jest sonda, składająca się z ostrza zamontowanego na sprężystym ramieniu (inaczej dźwigni lub belki). Sonda albo próbka (w zależności od konfiguracji) umieszczona jest na skanerze piezoelektrycznym, który pod wpływem przyłożonego napięcia zmienia swoją geometrię - odpowiednio wydłuża się bądź skraca w kierunku przyłożonego napięcia. W momencie kiedy mikroskop sił atomowych zacznie działać i gdy ostrze napotka zmianę topograficzną na powierzchni

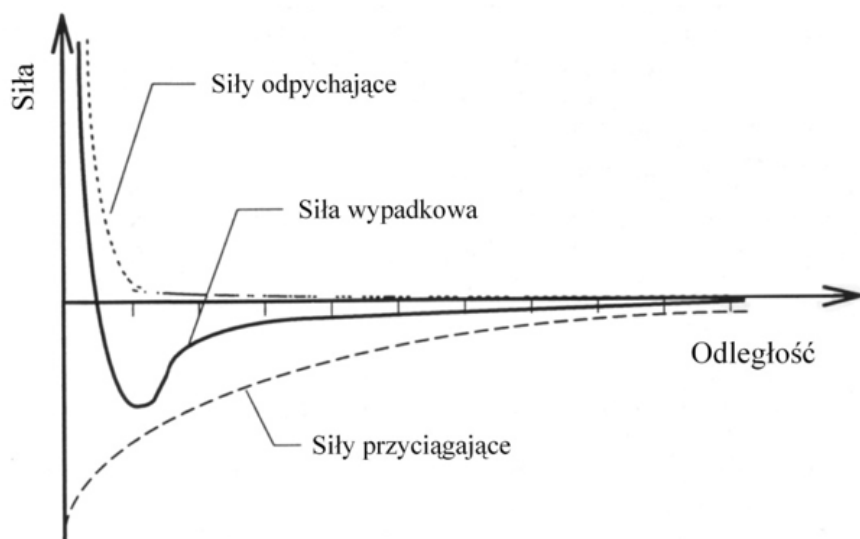
badanej próbki nastąpi ugięcie dźwigni proporcjonalne do zmiany topograficznej. Ugięcie to rejestrowane jest za pomocą lasera, którego wiązka światła skierowana jest na koniec belki i po odbiciu od niej pada na pozycyjnie czułą fotodiode (Rysunek 10.2). Ta stosunkowo prosta metoda detekcji zapewnia bardzo dużą czułość rejestracji ugięcia belki na poziomie 0.1 \AA ! Umożliwia to uzyskanie niespotykanej dla innych mikroskopów rozdzielczość w osi z, która jest o wiele mniejsza aniżeli rozmiar atomu. Dla odmiany rozdzielczość mikroskopu AFM w osiach x,y związana jest z dokładnością pozycjonowania próbki lub sondy w tych osiach i dla współczesnych skanerów piezoelektrycznych wynosi ok. 0.1 nm . Należy pamiętać, że na wypadkową rozdzielczość mikroskopu AFM nakłada się nie tylko czułość detekcji ruchów dźwigni oraz dokładność pozycjonowania ale również obszar oddziaływania ostrza z próbką. W idealnej sytuacji pojedynczy atom ostrza będzie oddziaływał z pojedynczym atomem próbki co, powinno umożliwić uzyskanie atomowej zdolności rozdzielczej. Taka rozdzielczość jest jednak możliwa tylko na bardzo równych podłożach o niskiej szorstkości. W praktyce większość próbek da się zmierzyć z molekularną zdolnością rozdzielczą. W przypadku próbek miękkich, które mogą ulec

Rysunek 10.2 Schemat przedstawiający zasadę działania mikroskopu AFM.



deformacji podczas skanowania pod wpływem przyłożonej siły, obszar oddziaływania dramatycznie wzrasta, co pociąga za sobą zmniejszenie efektywnej rozdzielczości. Dlatego w przypadku miękkiej materii przyjmuje się, że uzyskiwana rozdzielczość jest na poziomie promienia krzywizny ostrza. W przypadku obiektów takich jak komórki, rzeczywista rozdzielczość może być jeszcze mniejsza. Obszary peryferyjne komórek np. filopodia czy lamelipodia da się zobrazować z rozdzielczością na poziomie promienia krzywizny ostrza natomiast ciało komórki, które ulega jeszcze większej deformacji da się mierzyć z rozdzielczością zdefiniowaną przez kąt rozwarcia ostrza. W takim przypadku należy również uwzględnić kąt rozwarcia ostrza. Istotnym elementem budowy mikroskopu AFM jest układ sterujący mikroskopem oraz elektronika realizująca

Rysunek 10.3 Zależność oddziaływania pomiędzy ostrzem a próbką w funkcji odległości.



pętlę sprzężenia zwrotnego. Ze względu na wysoką czułość urządzenia ważne jest aby mikroskop AFM był odpowiednio izolowany od otoczenia w szczególności od wszelkiego rodzaju drgań mechanicznych. Wszegubecne drgania tłumią się za pomocą pasywnych lub aktywnych układów tłumiących natomiast drgania akustyczne eliminuje się wstawiając mikroskop do odpowiedniej komory akustycznej.

Podstawy fizyczne

Rejestrowane podczas skanowania wygięcie dźwigni jest wynikiem działania sił występujących pomiędzy atomami ostrza a atomami znajdującymi się na powierzchni próbki. Decydującą rolę w tych oddziaływaniach odgrywają przyciągające siły van der Waalsa oraz krótko-zasięgowe siły odpychające. Wypadkowa wartość oraz charakter (przyciągający lub odpychający) sił

zależy od wzajemnej odległości próbka-ostrze (Rysunek 10.3) i jest opisywany potencjałem Lennarda-Jonesa:

$$E(r) = -\frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}},$$

gdzie A i B to stałe zależne od typu oddziaływania.

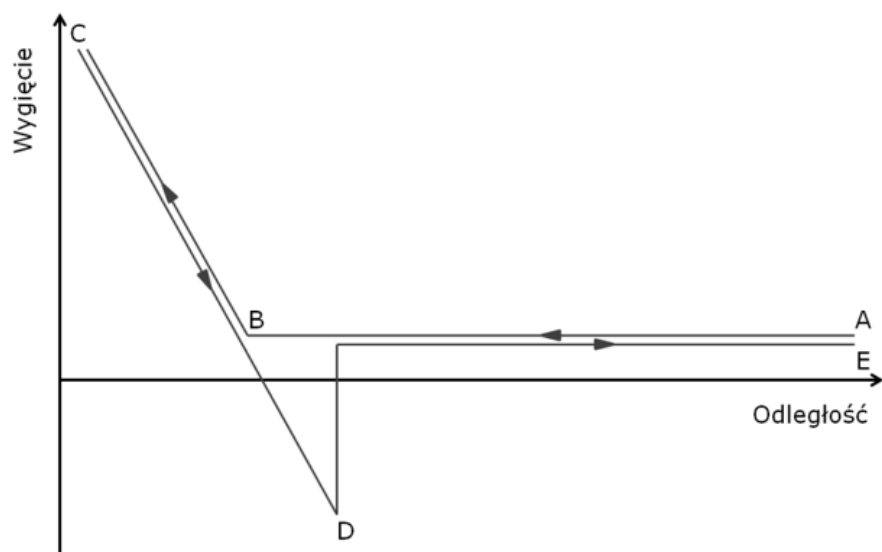
Dla kompletnego opisu oddziaływań pomiędzy ostrzem, a próbką należy uwzględnić również:

- * siły kapilarne,
- * siły elektrostatyczne,
- * siły adhezji,
- * siły dwuwarstwowe.

Spektroskopia sił

Najprostszym sposobem realizacji pomiaru przy użyciu mikroskopu AFM jest wykonywanie jednowymiarowych skanów czyli tzw. krzywych siła-odległość. Podejście to (nazywane również spektroskopią sił) znalazło bardzo szerokie zastosowanie w badaniach właściwości mechanicznych różnych materiałów w skali „nano” w tym również materiałów biologicznych [5]. Osobną gałęzią również opierającą się na pomiarze krzywych siła-odległość jest tzw. spektroskopia pojedynczych molekuł (*ang. single-molecule force spectroscopy*) [6], która jest stosowana np. do określenia dokładnej siły potrzebnej do rozwinięcia

Rysunek 10.4 Teoretyczna krzywa siła-odległość.



Na krzywych strzałkami zaznaczony jest kierunek skanowania. Poszczególne punkty oznaczają: A – punkt startowy, B – punkt kontaktu ostrza z próbką, C – punkt maksymalnego wygięcia (maksymalnej przyłożonej siły), D – punkt zerwania (maksymalnej adhezji) oraz E – punkt końcowy.

domen białkowych. Rysunek 10.4 przedstawia teoretyczną krzywą siła-odległość jaka byłaby zebrana na twardym materiale na którym występuje adhezja. Na podstawie analizy takiej krzywej można uzyskać informację dotyczącą właściwości mechanicznych badanej próbki takich jak: adhezja, elastyczność, energia dyssypacji, itp.

Tryby obrazowania

W związku z charakterem oddziaływania zależnym od odległości próbka-ostrze (Rysunek 10.3), wyróżnia się dwa główne tryby obrazowania za pomocą mikroskopu AFM:

* tryb kontaktowy (*ang. contact mode*);

* tryby bezkontaktowe (*ang. non-contact modes*).

Podczas pracy w trybie kontaktowym pomiędzy ostrzem a próbką dominują siły odpychające. Ostrze, o niskiej stałej sprężystości, znajduje się w bardzo niewielkiej odległości od próbki tak, że powłoki elektronowe atomów ostrza i próbki oddziałują ze sobą a siły oddziaływania rzędu nanoniutonów, powodują wygięcie dźwigni, które jest proporcjonalne do zmian topografii badanej próbki. Informację o badanej powierzchni można uzyskać na dwa sposoby: bezpośrednio – z detekcji ruchu dźwigni (mikroskop pracuje wtedy w tzw. trybie kontaktowym stałej wysokości) albo pośrednio – z ruchów piezoelementu (mikroskop pracuje wtedy w tzw. trybie kontaktowym stałej siły). W pierwszym przypadku dźwignia podczas skanowania naciska na próbkę z różną siłą zależną od topografii natomiast skaner utrzymuje próbkę na tej samej wysokości. Wadą takiego rozwiązania jest to, że w każdym punkcie podczas skanowania ostrze wywiera na próbkę inną siłę co może doprowadzić do jej lokalnego uszkodzenia. Ponadto w trybie kontaktowym stałej wysokości nie da się otrzymać ilościowej informacji o wysokości próbki a jedynie jakościowy pogląd o jej powierzchni. W drugim przypadku utrzymywana

jest stała siła nacisku ostrza na próbkę co powoduje, że mikroskop w każdym punkcie naciska z tą samą siłą nie niszcząc jej. Wadą trybu kontaktowego jest to, iż nie da się wyeliminować sił bocznych, które „szarpiąc” próbkę podczas skanowania mogą doprowadzić do jej zerwania. Siły boczne da się ograniczyć albo wręcz wyeliminować stosując jeden z poniższych tzw. dynamicznych trybów.

Tryb bezkontaktowy obejmuje obszar działania sił przyciągających. Siły działające pomiędzy ostrzem a próbką są znacznie mniejsze aniżeli w trybie kontaktowym, bo rzędu pikoniutonów. W trybie bezkontaktowym dźwignia o wysokiej stałej sprężystości znajduje się w pewnej odległości nad powierzchnią próbki (od 10 do 100 nm) oraz dodatkowo wprowadzana jest w drgania z częstością bliską częstości rezonansowej. Podczas zbliżania się sondy do próbki w trakcie skanowania rejestrowana jest zmiana amplitudy drgań dźwigni. Mikroskop aby utrzymać zadaną amplitudę wraz ze zmieniającą się topografią próbki reaguje poprzez zmianę położenia piezoelementu, odwzorowując tym samym topografię powierzchni próbki. Główną zaletą trybu bezkontaktowego jest możliwość pełnego wyeliminowania sił bocznych przez co pomiar staje się bardzo „delikatny”. Niestety jest to w dużej mierze tylko

teoria. Ograniczenia, przede wszystkim związane z bardzo niskim poziomem sygnału oraz właściwościami elektroniki sterującej, powodują, że praktyczne zastosowania tego trybu sprowadzają się do pomiaru nielicznych próbek. Z tego względu opracowano inny tryb zaliczany do bezkontaktowego, będący swego rodzaju połączeniem trybu kontaktowego i bezkontaktowego a mianowicie tryb przerywanego kontaktu (komercyjna nazwa często stosowana w literaturze to *Tapping mode*). Podobnie jak w trybie bezkontaktowym, belka o średniej stałej sprężystości wprowadzana jest w drgania z tak dobraną amplitudą i odległością od próbki, że samo ostrze „dziobie” powierzchnię badanej próbki. Główną zaletą trybu przerywanego jest znacznie większa stabilność pracy aniżeli w trybie bezkontaktowym. Należy zaznaczyć, że tryb przerywanego kontaktu od momentu zaprezentowania stał się najbardziej popularnym sposobem dokonywania pomiaru za pomocą mikroskopu AFM.

Ostatnio bardzo intensywnie rozwijane są tryby pomiarowe w oparciu o dokonywanie krzywych siła-odległość. Tego typu tryb nie ma swojej jednej nazwy i zależy od producenta. Główną zaletą tego typu rozwiązania jest to, że można bezpośrednio kontrolować siłę nacisku ostrza. Ponadto,

równoległe do topografii otrzymuje się informację o właściwościach mechanicznych badanej próbki.

Zastosowanie mikroskopu AFM

Mikroskop sił atomowych znajduje szerokie zastosowanie w nanotechnologii oraz naukach pokrewnych. Rutynowo wykorzystywany jest do badań powierzchni krzemu w przemyśle półprzewodnikowym jak również do miękkich materiałów takich jak polimery. Ta duża różnorodność stosowanych próbek wynika z tego, że mikroskop AFM praktycznie nie wymaga żadnej preparatyki. Jedyny wymóg stawiany próbce jest taki aby próbka mocno trzymała się podłoża ponieważ w przeciwnym razie mogłaby się przesunąć podczas skanowania, uniemożliwiając przeprowadzenie pomiaru. Ponadto mikroskop AFM może pracować niemalże w każdym środowisku od gazu po ciecz w dużym przedziale temperaturowym. Powoduje to, że coraz częściej wykorzystywany jest w biologii, w szczególności do pomiaru zmian topograficznych oraz właściwości mechanicznych komórek, zachodzących podczas różnych zmian chorobowych. Tego typu badania najczęściej przeprowadzane są na komórkach nowotworowych. Związane jest to z postulowaną rolą elastyczności komórek nowotworowych

w procesie metastazy [7]. Uważa się bowiem, że komórki nowotworowe, które w wyniku transformacji stają się bardzo miękkie i podatne na deformację mają ułatwioną zdolność pokonywania różnego rodzaju barier mechanicznych napotykanych w tkankach podczas przerzutowania. Historycznie główną wadą mikroskopu AFM był jego wolny czas skanowania. Pierwsze mikroskopy tego typu potrzebowały od kilku do kilkunastu minut na wykonanie jednego zdjęcia. Obecnie mikroskopy AFM są intensywnie rozwijane tak, aby znacznie przyspieszyć obrazowanie badanych próbek. Wstępne wyniki uzyskane przez eksperymentalne urządzenia tego typu, dostarczyły spektakularnych wyników. Przykładem może być zaobserwowanie „chodzącej” miozyny po filamencie aktynowym wykonane mikroskopem AFM pracującym w czasie rzeczywistym [8].

Literatura

1. Binnig G, Quate CF and Gerber C. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*. 1986, 56: 930-933.
2. Jahanmir J, Haggar BG, Hayes JB. The scanning probe microscope. *Scanning Microscopy*. 1992, 6: 625-660.

3. Binnig G and Rohrer H. Scanning tunneling microscopy. *Surface Science*. 1983, 126: 236-244.
4. Betzig E, Lewis A, Harootunian A, Isaacson M, Kratschmer E. Near field scanning optical microscopy (NSOM): development and biophysical applications. *Biophysical Journal*. 1986, 49: 269-279.
5. Thomas G, Burnham NA, Camesano TA, Wen Q. Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *Journal of Visualized Experiments*. 2013, 76: 50497.
6. Hughes ML, Dougan L. The physics of pulling polyproteins: a review of single molecule force spectroscopy using the AFM to study protein unfolding. *Reports on Progress in Physics*. 2016, 79: 076601.
7. Makale M. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Research*. 2007, 81: 329-343.
8. Koder N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*. 2010; 468: 72-76.

Wykonanie ćwiczeń

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z zasadą działania mikroskopu sił atomowych oraz przeprowadzenie pomiarów topografii i właściwości mechanicznych próbki biologicznej w skali „nano”. W czasie wykonywania ćwiczenia studenci zdobędą wiedzę na temat:

- * procedury przygotowania próbki biologicznej do pomiaru metodą AFM;
- * ustawienia parametrów niezbędnych do wykonania pomiaru;
- * przeprowadzenia pomiaru;
- * analizy i interpretacji otrzymanych wyników.

Wykonanie

Kilka dni przed ćwiczeniami materiał biologiczny (komórki wybranej linii) zostaną wysiane na naczynia hodowlane i pozostawione w inkubatorze w celu narośnięcia. Tuż przed ćwiczeniami komórki zostaną przeniesione z inkubatora i umieszczone na mikroskopie. Mikroskop AFM, jaki jest na wyposażeniu Pracowni Obrazowania i Spektroskopii Sił Atomowych Zakładu Biofizyki, to BioScope Catalyst firmy Bruker zamontowany na odwróconym mikroskopie optycznym Z1 firmy Zeiss z modułem do strukturalnego oświetlenia.

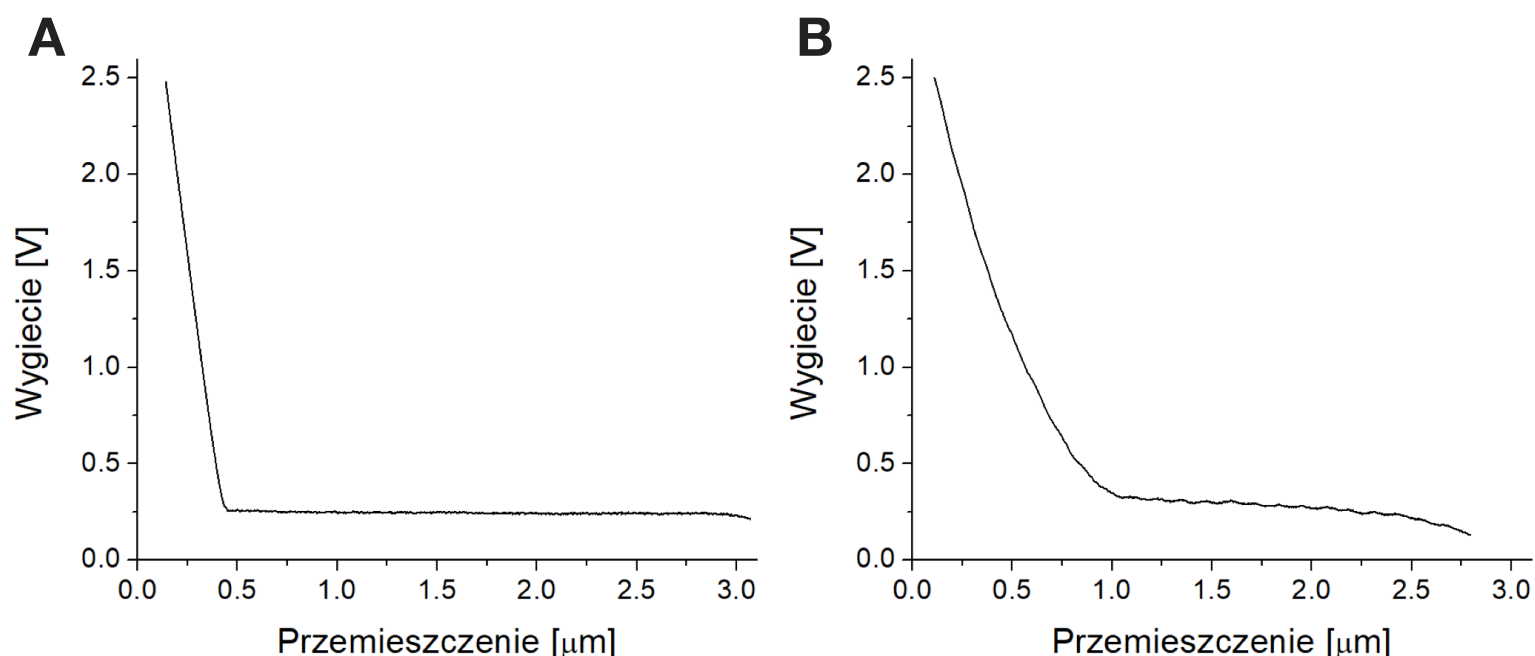
Ćwiczenie składa się z następujących etapów:

1. Omówienie elementów składowych mikroskopu AFM.
2. Ustawienie parametrów pomiarowych.
3. Rejestracja obrazu.
4. Wygenerowanie obrazu 3D oraz profili topograficznych.
5. Pomiar krzywej siłowej.
6. Omówienie charakterystycznych cech otrzymanej krzywej.

Opracowanie wyników

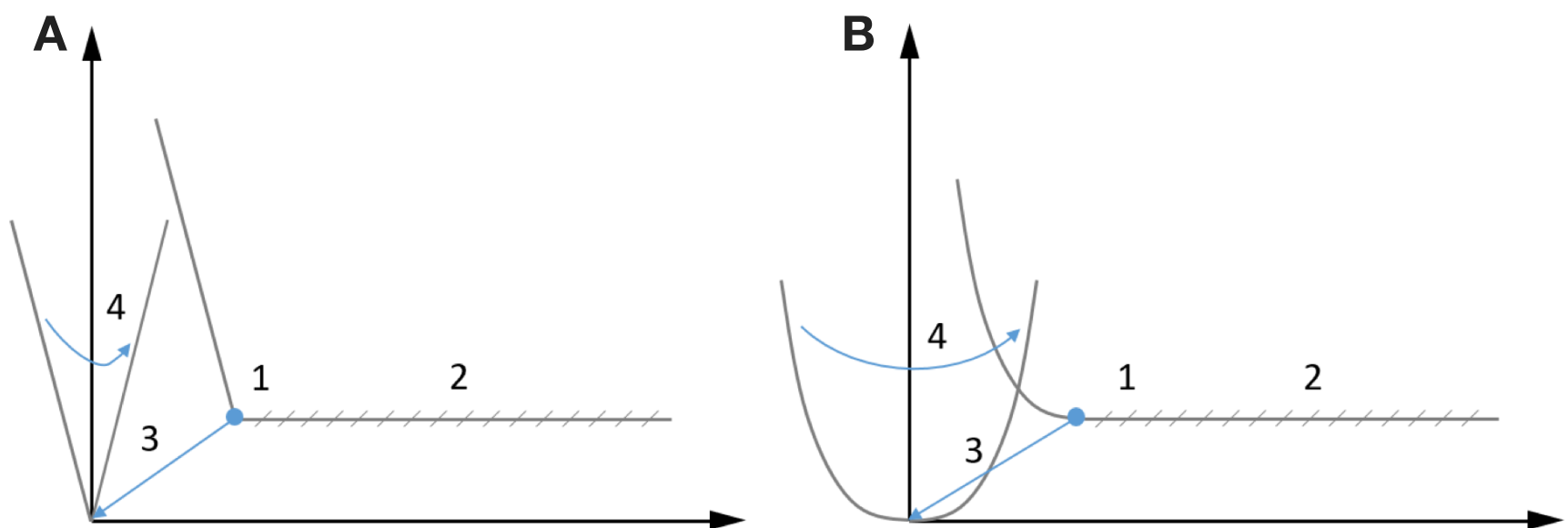
W trakcie ćwiczenia zostanie wykonany pomiar krzywej siłowej oraz przeprowadzona będzie analiza uzyskanych danych. Analiza ta ma doprowadzić do wyznaczenia modułu elastyczności (tzw. modułu Younga) badanego materiału w oparciu o model Hertza odkształceń elastycznych, a dokładniej o model zmodyfikowany przez Sneddona. W tym celu wykorzystane zostaną dwie krzywe siłowe: krzywa kalibracyjna oraz krzywa pomiarowa. Krzywa kalibracyjna jest to krzywa zebrana na materiale twardym (np. pusty obszar szalki Petriego, bez komórek) i jest potrzebna do przeliczenia wartości ugięcia dźwigni z woltów na niutony. Ponadto, w dalszej części analizy, potrzebne będzie wyznaczenie wartości indentacji, czyli głębokości na jaką ostrze zdeformowało próbkę. Krzywa pomiarowa jest to krzywa zebrana z materiału, którego moduł Younga ma być wyznaczony (np. komórki). Rysunek 10.5 przedstawia przykładową krzywą kalibracyjną i krzywą pomiarową.

Rysunek 10.5 Przykładowe krzywe siłowe: krzywa kalibracyjna (A) oraz krzywa pomiarowa (B).



Interesującym obszarem na analizowanej krzywej siłowej jest tzw. obszar po-kontaktowy. Punkt kontaktu opisuje moment zetknięcia ostrza z próbką i musi być wyznaczony. Tak więc pierwszym etapem analizy krzywych siłowych jest wyznaczenie punktu kontaktowego, następnie „usunięcie” punktów przed-kontaktowych oraz „sprowadzenie” punktów po-kontaktowych do początku układu współrzędnych. Dodatkowo dokonuje się odbicia „lustrzanego” względem osi Y. Rysunek 10.6 schematycznie przedstawia poszczególne etapy obróbki krzywych siłowych.

Rysunek 10.6 Etapy analizy krzywych siłowych.



Punkty odnoszą się do poszczególnych kroków: 1 – wyznaczenie punktu kontaktu, 2 – usunięcie punktów przed-kontaktowych, 3 – sprowadzenie obszaru po-kontaktowego do początku układu współrzędnych, 4 – odbicie lustrzane względem osi Y.

Należy zaznaczyć, że krzywe siła-odległość uzyskane bezpośrednio z mikroskopu przedstawiają zależność napięcia na fotodiodzie U odpowiadającą wygięciu belki od przemieszczenia skanera piezoelektrycznego. Aby uzyskać krzywe przedstawiające zależność siły od przemieszczenia należy dokonać kalibracji, czyli przeliczyć napięcie na siłę. W tym celu wykorzystuje się liniowy fragment krzywej kalibracyjnej. Nachylenie a prostej dopasowanej do obszaru po-kontaktowego krzywej kalibracyjnej (rysunek 10.7A) wykorzystywany jest do przeliczenia napięcia na siłę wg. wzoru:

$$F[N] = a \left[\frac{\mu m}{V} \right] \cdot k \left[\frac{N}{m} \right] \cdot U[V] \cdot 10^{-6}$$

gdzie: a – parametr nachylenia prostej dopasowanej do krzywej kalibracyjnej, k – stała sprężystości używanej sondy natomiast U – wartość napięcia.

Właściwości elastyczne materiału określa charakterystyczna dla badanego materiału zależność pomiędzy siłą nacisku F a indentacją Δz . Dla idealnie twardego materiału indentacja wynosi zero. W praktyce mamy jednak do czynienia z materiałami odkształcalnymi a wielkość odkształcenia zależy od przyłożonej siły oraz podatności danego materiału na odkształcenie. W celu wyznaczenia wielkości indentacji dokonuje się „odjęcia” po-kontaktowego obszaru krzywej pomiarowej od po-kontaktowego obszaru krzywej kalibracyjnej. Wartość indentacji w danym punkcie to różnica w przemieszczeniu (oś X) pomiędzy punktem pomiarowym a punktem kalibracyjnym dla tej samej wartości siły

nacisku (oś Y) (graficznie pokazane jest to na rysunku 10.7B). Poniżej zebranych jest dla przykładu kilka takich punktów:

$$Pkt_n K_p - Pkt_n K_k$$

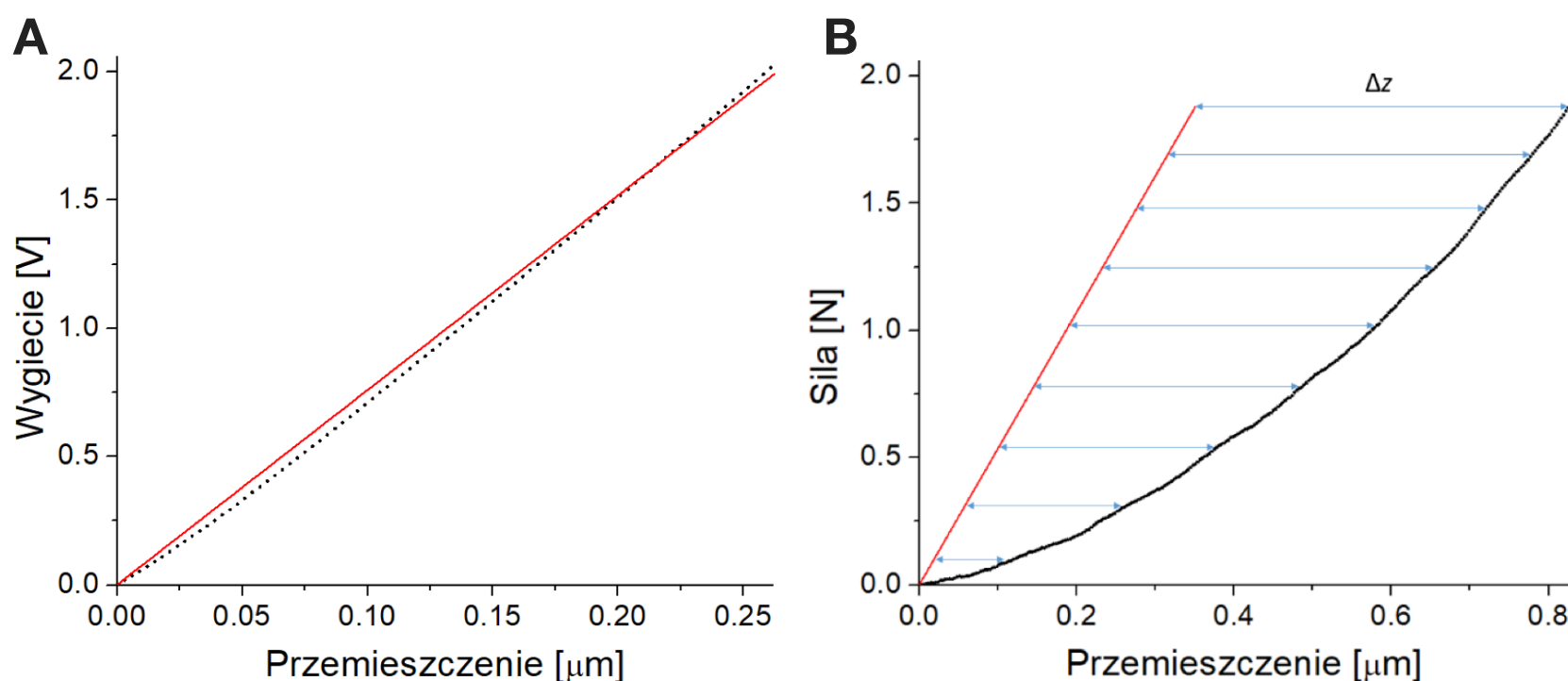
$$Pkt_{n-1} K_p - Pkt_{n-1} K_k$$

...

$$Pkt_0 K_p - Pkt_0 K_k$$

gdzie: $Pkt_n K_p$ to ostatni punkt na krzywej pomiarowej, $Pkt_n K_k$ to ostatni punkt na krzywej kalibracyjnej, itd.

Rysunek 10.7 Po-kontaktowy obszar krzywej kalibracyjnej z dopasowaną funkcją liniową (A) oraz graficzne przedstawienie wyznaczenia indentacji (B).



Tyle ile jest punktów na krzywej pomiarowej, tyle par należy dobrać i odjąć od siebie. Największą trudnością w trakcie odejmowania od siebie obydwu krzywych jest znalezienie pary odpowiadającej takiej samej wartości siły. Należy zaznaczyć, że krzywe pomiarowa i kalibracyjna są to niezależne od siebie pomiary. W związku z tym, aby móc odjąć od siebie te punkty należy skorzystać z wcześniej wyznaczonego parametru nachylenia krzywej kalibracyjnej. Po przekształceniu wzoru na równanie prostej ($y = ax$), można wyznaczyć dowolny punkt na krzywej kalibracyjnej odpowiadający szukanej wartości siły

nacisku. Po dokonaniu tej operacji i odjęciu tych krzywych od siebie dostaje się krzywą zależności siły od indentacji. Do tej zależności dopasowywana jest funkcja w postaci:

$$F(\Delta z) = A \cdot \Delta z^2$$

Na podstawie znajomości parametru A moduł elastyczności wyznaczany jest wg. poniższego wzoru:

$$E = \frac{\pi(1 - \mu^2)}{2 \tan(\alpha)}$$

gdzie: E jest modułem Younga komórki, μ to współczynnik Poissona komórki (bezwymiarowa wartość dla komórek przyjmuje się wartość równą 0.5), α jest kątem rozwarcia ostrza (dla używanego podczas ćwiczeń ostrza wynosi 25°).

Moduł Younga wyrażany jest w paskalach (Pa) i dla komórek jego wartość powinna mieścić się w przedziale: 0,5-20 kPa.