



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123318** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)**G01N 15/14** (2006.01)**G01N 15/00****G01N 15/06** (2006.01)**G01N 1/40** (2006.01)НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2018 07032	(72) Винахідник(и):	Нордстрьом Ріккард (SE), Сінторн Іда-Марія (SE), Хааг Ларс (SE)
(22) Дата подання заявки:	21.10.2016	(73) Володілець (володільці):	ІНТЕЛЛІДЖЕНТ ВАЙРЕС ІМІДЖІНГ ІНК., 26 Pinecrest Plaza, Suite 2, Southern Pines, North Carolina 28387-4301, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	18.03.2021	(74) Представник:	Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр. №4
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/269,465	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2003024877 A1, 06.02.2003 US 2010151446 A1, 17.06.2010 US 5385672 A, 31.01.1995 US 2009049742 A1, 26.02.2009 US 2009020555 A1, 22.01.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	18.12.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2018, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	17.03.2021, Бюл.№ 11		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2016/058011, 21.10.2016		

(54) ВИСОКОТОЧНА КВАНТИФІКАЦІЯ НЕВИДИМИХ НЕОЗБРОЄНИМ ОКОМ ЧАСТИНОК**(57) Реферат:**

Спосіб призначений для квантифікації невидимих незброєним оком частинок. Використовують фільтрувальну мембрану (116), яка має сформовані в ній пори (138). Фільтрувальна мембрана (116) функціонально з'єднана з вакуумною камерою (104). Пори герметизуються герметиком (140). Краплю (126) зразка, яка містить рідину (144) і невидимі незброєним оком частинки (142), наносять на фільтрувальну мембрану (116). Рідина (144) розчиняє герметик (140) в порах (138e-138h), розташованих безпосередньо під краплею (126) зразка. Рідина (144) протікає крізь пори, у яких був розчинений герметик (140), а невидимі незброєним оком частинки (142) залишаються на верхній поверхні фільтрувальної мембрани (116). Частинки (142) нумерують в електронній мікроскопії.

UA 123318 C2

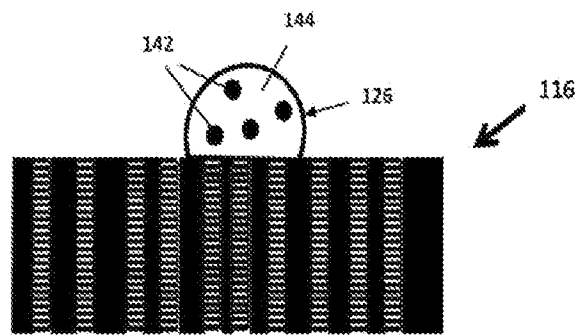


Fig. 5C

Галузь Техніки

Представлений винахід відноситься до способу високоточної квантифікації невидимих неозброєним оком частинок, таких як мікрочастинки і/або наночастинки, з використанням мікроскопії, такої як сканувальна електронна мікроскопія (SEM).

5 Рівень техніки і Короткий Опис Винаходу

В багатьох процесах важливим є точний підрахунок кількості невидимих неозброєним оком частинок, таких як вірусні частинки, вірусоподібні частинки, неорганічні і полімерні кульки, та інших наночастинок і мікрочастинок з рідких зразків. Наприклад, модифіковані вірусні вектори зазвичай використовуються в застосуваннях генної терапії. Кількість активних векторів на мл (інфекційний титр вірусного зразка) може визначатися з використанням стандартних тестувань на інфективність. Однак, використовуючи на даний момент доступні способи, неможливо точно визначити загальну кількість частинок у зразку, включаючи неінфекційні частинки. Відношення кількості інфекційних частинок до кількості неінфекційних частинок надає безцінну інформацію про якість і ефективність кінцевого продукту генної терапії і попередні процеси розвитку.

15 Одним значним обмеженням на даний момент доступних технологій, таких як квантифікуюча проточна цитометрія (QFCM), є те, що наночастинки, які представляють цікавість, безпосередньо не виявляються. Замість цього, для популяції наночастинок проводять кількісний аналіз зв'язаних проб. Оскільки кількість проб, які зв'язуються, на наночастинку змінюється, то точність традиційних опосередкованих технологій є типово низькою і залежить від родової спорідненості між зразком і пробою. Технологія, де наночастинка, яка представляє цікавість, може безпосередньо виявлятися, повинна долати це обмеження. Більше того, якщо технологія повинна мати можливість візуалізувати частинки з достатньою роздільною здатністю, то окремі частинки можуть ідентифікуватися на основі їх розміру і морфології, і, таким чином, безпосередньо підраховуватися. Навіть можуть підраховуватися і оцінюватися частинки в кластерах. Це неможливо шляхом використання на даний момент доступних способів розділення сумішей або технологій на основі розсіяння світла.

Може використовуватися новий спосіб високоточного безпосереднього підрахунку частинок представленого винаходу для підрахунку неорганічних і органічних невидимих неозброєним оком частинок з рідких зразків, таких як наночастинки. Однією важливою ознакою є те, що зразки наносять з одержанням чіткого здатного до вимірювання сліду. Іншою важливою ознакою є те, що зразки однорідніше розподіляються ніж, як це було можливо до цього, і це послаблює потребу у відборі зразків, і тепер можна проводити аналіз за роздільної здатності, де окремі частинки можуть легко ідентифікуватися. Невидимі неозброєним оком частинки виявляються безпосередньо без потреби у сигнальних пробах і можуть візуалізуватися в нормальних двовимірних зображеннях. Спосіб квантифікації частинок з використанням сканувального електронного мікроскопа (SEM) (pqSEM) представленого винаходу переважно базується на низьковакуумному фільтруванні, сканувальній електронній мікроскопії (SEM) або інших технологіях електронної мікроскопії і аналізу зображень. Представлений винахід може використовуватися з або без внутрішніх стандартів, прикладом яких повинні бути полістиролові кульки, описані Національним Інститутом Стандартів і Технологій (NIST).

Представлений винахід надає рішення для вищеописаних проблем. Точніше, спосіб передбачений для квантифікації невидимих неозброєним оком частинок. Надається мембрана фільтра, яка має сформовані в ній пори. Фільтрувальна мембрана функціонально з'єднується з вакуумною камерою. Пори герметизуються герметиком. Крапля зразка, яка містить рідину з невидимими неозброєним оком частинками, наноситься на фільтрувальну мембрану. Рідина розчиняє герметик в порах, розташованих безпосередньо під краплею зразка. Рідина протікає крізь пори, у яких розчинився герметик, а невидимі неозброєним оком частинки залишаються на верхній поверхні фільтрувальної мембрани. Фільтрувальну мембрану з розміщеними на ній частинками подають до електронного мікроскопу і підраховують частинки в зображеннях, отриманих в мікроскопії.

У способі додатково попередньо встановлюють фільтрувальний блок, який містить фільтрувальну мембрану, на предметному столику сканувального електронного мікроскопа (SEM).

У способі додатково на предметний столик сканувального електронного мікроскопа (SEM) поміщають монтажну стрічку.

У способі додатково передбачають предметний столик сканувального електронного мікроскопа (SEM), який має сформований в ньому продовгуватий канал, використовують ін'єктор, який містить краплю зразка, і орієнтують ін'єктор на верхній частині продовгуватого каналу перед поміщенням краплі зразка на фільтрувальну мембрану.

У способі додатково з'єднують предметний столик сканувального електронного мікроскопа (SEM) з вакуумною камерою, з'єднаною з джерелом вакууму, і піддають фільтрувальну мембрану дії підсмоктувальної сили за допомогою продовгуватого каналу.

У способі додатково поміщають краплю зразка на фільтрувальну мембрану без торкання краплею зразка якогось зовнішнього краю фільтрувальної мембрани.

У способі додатково рідина розчиняє герметик тільки в порах, розташованих безпосередньо під краплею зразка, тоді як сусідні пори на стороні краплі залишаються загерметизовані герметиком, оскільки рідина не контактувала з герметиком, розташованим у таких порах.

У способі додатково невидимі неозброєним оком частинки формують на фільтрувальній мембрані чіткий і вимірюваний слід, і отримують ряд зображень частинок від зовнішньої периферії сліду до центру сліду.

У способі додатково або вручну або автоматично з використанням способів аналізу зображень підраховують частинки в зображеннях електронної мікроскопії, отриманих з роздільною здатністю, де частинки чітко видимі.

У способі додатково оцінюють загальну площу сліду на фільтрувальній мембрані в зображеннях мікроскопії, які покривають увесь слід (або одне зображення з малим збільшенням, яке покриває увесь слід, або декілька зшитих фрагментів зображень сліду з більшим збільшенням).

У способі додатково підраховують загальну кількість частинок в зразку з площі усього сліду і кількість частинок на одиницю площі, отриману із зображень з досить високою роздільною здатністю для чіткого розглядування окремих частинок.

У способі додатково по можливості компенсують неоднорідний радіальний розподіл частинок в сліді, для чого інформацію одержують з ряду зображень, які одержуються від периферії сліду з проходженням центру, з досить великим збільшенням для чіткого розглядання окремих частинок.

У способі додатково обраховують концентрацію частинок в розчині з використанням загальної оцінки частинок зі сліду, нанесеного об'єму і розрідження рідкого зразка.

У способі додатково використовують розріджувач рідини для розчинення герметика в порах, розташованих безпосередньо під краплею зразка. Зразок повинен бути у рідкій формі і повинен бути сумісним з розріджувачем та мати властивість ефективного розчинення герметика, який використовується.

У способі додатково як герметик використовують гліцин. Інші герметики, які можуть використовуватися, включають, але не обмежуються герметиками на основі трегалози/цукрози.

Короткий Опис Креслень

Фіг. 1 зображає схематичний вигляд збоку вакуумного пристрою представленого винаходу;

Фіг. 2 зображає схематичний вигляд збоку поперечного перерізу фільтрувального блока;

Фіг. 3А зображає необроблене зображення полістиролових кульок зі сканувального електронного мікроскопу (SEM) з великим збільшенням, які прилипли до поліетерсульфонного фільтра;

Фіг. 3В показує зображення виявлених і пронумерованих полістиролових кульок зі сканувального електронного мікроскопу (SEM) з великим збільшенням, які прилипли до поліетерсульфонного фільтра;

Фіг. 3С зображає вигляд зблизька і зверху зображення зі сканувального електронного мікроскопа (SEM) з Фіг. 3В;

Фіг. 4А зображає схематичний вигляд краю зображення сліду краплі з використанням сканувального електронного мікроскопа (SEM) (первинні електрони) з великим збільшенням;

Фіг. 4В зображає схематичний вигляд краю зображення сліду краплі з використанням сканувального електронного мікроскопа (SEM) (первинні електрони) з малим збільшенням;

Фіг. 5А зображає схематичний вигляд збоку поперечного перерізу мембрани представленого винаходу з відкритими порами;

Фіг. 5В зображає схематичний вигляд збоку поперечного перерізу мембрани, зображеної на Фіг. 5А, але із загерметизованими порами;

Фіг. 5С зображає схематичний вигляд збоку поперечного перерізу мембрани представленого винаходу, зображеної на Фіг. 5В, яка має розташовану на ній краплю зразка;

Фіг. 5D зображає схематичний вигляд збоку поперечного перерізу мембрани, зображеної на Фіг. 5С, яка має краплю, яка поглинута мембраною представленого винаходу; і

Фіг. 6 зображає збільшений вигляд з Фіг. 5D.

Детальний Опис

Спосіб представленого винаходу описується з посиланням на Фіг. 1-6. Фіг. 1 зображає схематичний вигляд спереду вакуумного блока 100, який має вакуумний пристрій 102, з'єднаний

з вакуумною камерою 104 за допомогою гнучкого трубопроводу 106, який проходить між ними. Переважно, гнучкий трубопровід 106 має відповідний клапан, такий як клапан Люера 108. Вакуумний манометр 110 функціонально з'єднаний з вакуумною камерою 104 для вимірювання в ній вакуумного тиску. Фільтрувальний блок 112 встановлюють за допомогою його тримача 114 на верхній частині вакуумної камери 104. Фільтрувальну мембрану 116 розташовують на фільтрувальному блоці 112. Ін'єктор 118 розташовують над фільтрувальною мембраною 116.

Фіг. 2 зображає схематичний вигляд поперечного перерізу фільтрувального блока 112. Увесь процес аналізу представленого винаходу може спрощуватися шляхом попереднього встановлення фільтрувальної мембрани 116 на предметний столик сканувального електронного мікроскопа (SEM) (коротка стійка з оксиду алюмінію) 120 замість виконання цього вручну, коли фільтрувальна мембрана 116 містить пробу/зразок, який аналізується і обраховується. Встановлення може виконуватися шляхом простого свердління отвору у короткій стійці 120 сканувального електронного мікроскопа (SEM). Застосування такого пристрою мінімізує ризик втрати зразка або uszkodження фільтрувальної мембрани 116 під час попереднього етапу, на якому фільтрувальною мембраною 116, яка містить зразок, маніпулюють вручну під час встановлення на коротку стійку 120 сканувального електронного мікроскопа (SEM). Деталі підготовки фільтрувальної мембрани 116 описуються нижче. Такий аналітичний пристрій, який витрачається, на основі сканувальної електронної мікроскопії (pqSEM) є відносно недорогим для виготовлення.

Точніше, фільтрувальний блок 112 переважно має модифіковану коротку стійку 120 з оксиду алюмінію сканувального електронного мікроскопа (SEM), на якій поміщена двостороння вуглецева монтажна стрічка 122. Загерметизовану пористу фільтрувальну мембрану 116 поміщають на верхню поверхню вуглецевої монтажної стрічки 122. Процес герметизації фільтрувальної мембрани 116 описується в деталях нижче, зокрема, з посиланням на Фіг. 5-6. Ін'єктор 118, який містить зразок або пробу 124, що аналізується, розташовують або поміщають над фільтрувальною мембраною 116 і використовують для поміщення краплі 126 зразка на фільтрувальну мембрану 116. Оскільки коротка стійка 120 герметично з'єднується з тримачем 114 фільтрувального блока, який, своєю чергою, встановлюється на вакуумній камері 104, всередині короткої стійки 120 присутній вакуум таким чином, що вакуум прикладає підсмоктувальну силу до фільтрувальної мембрани 116 знизу фільтрувального блока 112. Це можливо, оскільки продовгувата порожнина або канал 128, сформований всередині короткої стійки, гідравлічно сполучений з фільтрувальною мембраною 116 і вакуумною камерою 104. Як описується нижче, важливо, щоб ін'єктор 118 вірно розташовували над фільтрувальною мембраною 116 таким чином, щоб, коли крапля 126 зразка поміщалася на фільтрувальну мембрану 116, вона не контактувала з краями фільтрувальної мембрани 116 і розташовувалась безпосередньо над продовгуватою частиною 129 порожнини, яка сформована між каналом 128 і нижньою стороною монтажної стрічки 122. Переважно, крапля 126 поміщається в або біля центру частини 129 порожнини, який лежить на поздовжній осі (L), яка проходить крізь канал 128.

Фіг. 3A-3C показують зображення з великим збільшенням полістиролових кульок, які прилипли до поліетерсульфонного фільтра, зі сканувального електронного мікроскопа (SEM). Фіг. 3A показує необроблене зображення 130, а Фіг. 3B показує виявлене зображення 132 з пронумерованими частинками. Фіг. 3C зображає вигляд зблизька 133 вигляду з Фіг. 3B і частини 131 з Фіг. 3A. У цих ілюстративних зображеннях в області огляду розміром $131,47 \text{ мкм}^2$ виявляли 77 частинок. Це відповідає приблизно 0,59 частинок на мкм^2 . Вигляд 133 показує пронумеровані частинки 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 28, 29, 30.

Фіг. 4A-4B зображають край сліду краплі, зображеного з використанням сканувального електронного мікроскопа (SEM) (первинні електрони). Фіг. 4A показує зображення 134 з великим збільшенням, а Фіг. 4B показує зображення 136 сліду з малим збільшенням. Місцезнаходження зображення 134 з великим збільшенням, показане на Фіг. 4A, позначене білою стрілкою на Фіг. 4B таким чином, що зображення 134 показує частину зображення 136 усього сліду. Край краплі чітко визначається нехтуваною кількістю частинок зовні сліду. При малому збільшенні увесь слід 136 краплі візуалізується і може точно визначатися площа сліду. У цьому прикладі, площа сліду (A_{total}) становила $8,436 \text{ мм}^2$.

Фіг. 5A-5D зображають вигляди збоку поперечного перерізу фільтрувальної мембрани 116 та описують процес герметизації фільтрувальної мембрани 116 і потім розчинення герметика. На Фіг. 5A фільтрувальна мембрана 116 має відкриті пори 138, сформовані між продовгуватими ґратчастими елементами 139 фільтрувальної мембрани 116, які проходять крізь фільтрувальну мембрану 116. На Фіг. 5B пори 138 заповнені герметиком 140. На Фіг. 5C крапля 126 зразка 124, який є рідиною 144, яка містить частинки 142, які аналізуються, поміщена на фільтрувальний

мембрані 116. Переважно, крапля 126 поміщається на фільтрувальну мембрану 116 шляхом використання вищеописаного ін'єктора 118. При контактуванні краплі 126 з герметиком 140, рідина 144 розчиняє герметик 140, який знаходиться безпосередньо під краплею 126, таким чином, що рідина 144 поглинається і проходить крізь пори 138, розташовані тільки під краплею 126. Оскільки частинки 142, які нумеруються, мають розмір, який перевищує розмір пор 138 мембрани, вони поміщаються на верхню поверхню фільтрувальної мембрани 116, тоді як рідина і будь-які забруднюючі речовини 144 з меншим розміром частинок поглинаються або протікають в пори 138 під краплею 126, оскільки герметик 140 в таких порах розчиняється і рідина 144 піддається дії підсмоктувальної сили від продовгуватого каналу 128 вакуумної камери 104 під фільтрувальною мембраною 116.

Фіг. 6 показує збільшений вигляд фільтрувальної мембрани 116 з Фіг. 5D. Невидимі неозброєним оком частинки 142 лежать на фільтрувальній мембрані 116 і вони більші за пори 138a-138j таким чином, що вони не проходять крізь пори навіть, коли пори відкриті і піддаються дії підсмоктувальної сили з вакуумної камери 104 (показана на Фіг. 1). Пори 138a-d і 138i-j все ще заповнені герметиком 140, оскільки він ще не був розчинений рідиною 144, оскільки він не контактував з рідиною 144 краплі 126 зразка (дивіться Фіг. 5C). Точніше, розріджувач, такий як відповідний буферний розчин, в рідині 144 розчиняє герметик 140. Як вказано вище, розріджувач повинен бути сумісним із зразком, тобто, мати мінімальний вплив на морфологію зразка і агрегатний стан. Розріджувач повинен також мати властивість розчиняти герметик. Це гарантує те, що вакуум підтримується тільки в сліді і, таким чином, що прилад не втрачає вакуум шляхом "відкривання" пор зовні ділянки, яка представляє цікавість. Коли рідина 144 розчиняє герметик 140, розташований в порах 138e-138h, вона заповнює пори 138e-138h для заміщення герметика 140. Це полегшує нумерацію частинок 142, оскільки вони лежать на верхній поверхні фільтрувальної мембрани 116 і гарно розподілені по фільтрувальній мембрані 116.

Приклад

Нижче наведений ілюстративний приклад способу підготовки фільтрувальної мембрани 116 згідно з представленим винаходом.

1. Зразок, який містить невидимі неозброєним оком частинки 142, такі як мікрочастинки і/або наночастинки, готують для нумерації шляхом послідовного розрідження його у відповідному розріджувачі (типово вода, фосфат-сольовий буфер, HEPES(N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота)-сольовий буфер, TRIS-сольовий буфер або гістидин-сольовий буфер) в залежності від буферних умов кожного конкретного зразка.

2. Зв'язуючий агент (типово глутаральдегід або формальдегід) і/або стабілізуючий агент (типово цукроза або гліцерин) може вводиться в розчин 124 розрідженого зразка, що також містить невидимі неозброєним оком частинки 142, для стабілізації і збереження структури частинок і, в деяких зразках, для запобігання небажаних агрегації частинок 142. Зв'язуючі/стабілізуючі агенти і розріджувач відповідають рідині 144 і разом з частинками 142 формують пробу/зразок 124 і краплю 126 зразка. Зв'язуючі/стабілізуючі агенти використовуються для запобігання руйнування або пошкодження частинок 142 під час маніпуляції ними і небажаному злипанню їх між собою, що утруднює подальшу нумерацію їх.

3. Фільтрувальний блок 112 складається з пористої фільтрувальної мембрани 116 (типово виготовленої з поліетерсульфону або полікарбонату) з порами 138, які мають визначений розмір (типово 0 – 15 нм), і здатної до відкривання фільтрувальної касети, виготовленої з пластику або еквівалентного матеріалу, використовуваних для відділення частинок 142 від рідини. Відповідний фільтрувальний блок 112 найкраще показаний на Фіг. 2. Загалом, фільтри беруться великими партіями як одноразові фільтри і, таким чином, їх потрібно на щось встановлювати. Деякі постачальники також продають тримачі фільтрів і ці пристрої первинно виготовляються для з'єднання зі шприцом і подачі рідини крізь нього, і, таким чином, не засмоктуючи рідину крізь нього з використанням вакууму. Тому, потрібно кріпити фільтр на фільтрувальному блоці для забезпечення цілісності вакууму. Після деякого експериментування, на подив було виявлено, що фільтр можна встановлювати безпосередньо на предметному столику сканувального електронного мікроскопа (SEM), що економить час і усуває критичні етапи ручної маніпуляції фільтрами, які містять зразок. Ймовірно, що такий блок може недорого виготовлятися і продаватися як такий, що витрачається сканувальним електронним мікроскопом (SEM).

4. Фільтрувальний блок 112 встановлюють на верхню частину пластикової вакуумної камери 104, яка, своєю чергою, з'єднується з вакуумним пристроєм 102 за допомогою гнучкого трубопроводу 106.

5. Вакуум у вакуумній камері 104 контролюється 3-ходовим клапаном Люера 108 і відслідковується з використанням вакуумного манометра 110. Може також втілюватися автоматична система, яка використовує магнітні клапани, керовані електронною відслідковувальною системою.

6. Пори 138 у фільтрувальній мембрані 116 переважно герметизується герметиком 140, таким як гліцин (або еквівалентом), перед нанесенням краплі 126 зразка, як найкраще показано на Фіг. 5B і 5C. На подив і неочікувано було виявлено, що шляхом використання герметика 140 у фільтрувальній мембрані 116, частинки 142 всередині краплі 126 розподілялись однорідніше (перед видаленням рідини 144 краплі 126) і не було потреби використовувати велику вакуумну силу для зниження ризику неоднорідного розтікання краплі на фільтрувальній мембрані. Слід відзначити, що розподіл частинок не повинен бути однаковим на зовнішній периферії і в центрі. Схема розподілу частинок може визначатися шляхом сканування сліду 134/136 (дивіться Фіг. 4A-4B) зразка з частинками, поміщеного на фільтрувальній мембрані, від зовнішньої периферії або зовнішнього краю 137 сліду 136 в напрямі до центру 139 сліду зразка з частинками. Якщо просканована частина зразка з частинками має певну схему розподілу частинок, можна впевнено припустити, що однакова схема розподілу частинок застосовується навколо усього круглого сліду 136 зразка з частинками частково через те, що частинкам надали годинний період для осідання перед розчиненням герметика 140 рідиною в краплі 126. Оскільки крапля 126 спершу поміщається на загерметизовану фільтрувальну мембрану 116, зовнішній край 137 сліду 136 краплі 126 стає відносно чітким або гострим, що важливо для визначення того, де починати нумерацію і сканування в напрямі до центру 139 круглого зразка з частинками або сліду 136, поміщеного на розчинену фільтрувальну мембрану 116. Неочікувано було виявлено, що переваги відносно однорідного розподілу частинок на фільтрувальній мембрані переважають недоліки, пов'язані з необхідністю видалення герметика для надання можливості рідині в краплі протікати крізь фільтрувальну мембрану до початку нумерації частинок. Будь-яка неоднорідна або нечітка периферія сліду краплі на фільтрувальній мембрані утруднює визначення її сліду і знання того, яку ділянку потрібно аналізувати для підрахунку усіх частинок в краплі. Наносячи краплю 126 зразка на фільтрувальну мембрану 116, усі пори 138 якої загерметизовані герметиком 140, частинки 142 однорідно розподіляються всередині краплі 126, оскільки крапля 126 розтікається по загерметизованій верхній поверхні фільтрувальної мембрани 116. Необхідність розчинення герметика 140 спершу уповільнює протікання рідини 144 крізь пори 138. Не використовуючи герметик 140, рідина 144 краплі 126 повинна негайно починати протікати крізь пори 138 і, оскільки крапля 126 найтовща в центрі і тонша на своїй периферії, то більше частинок 142 мають тенденцію розміщуватися в середині краплі. Це часто приводить до неоднорідного розподілу частинок на фільтрувальній мембрані і зовнішній край сліду зразка з частинками не чіткий. Слід відмітити, що більше частинок не завжди розташовуються в середині краплі, оскільки деякий зразок може мати тенденцію концентруватися в напрямі до межі розділу між повітрям і водою. Загалом важко точно передбачити як поведуть себе і розподіляються різні зразки.

Оскільки увесь слід 136 краплі 126 зразка використовується для обрахунку концентрації частинок 142, крапля 126 не повинна торкатися внутрішнього краю тримача фільтрувальної мембрани 116. Таким чином, важливо, щоб тільки визначена частина фільтрувальної мембрани 116 покривалась краплею 126 зразка. Це гарантує те, що нумеруються або підраховуються усі частинки 142 в краплі 126. Також, крапля 126 зразка повинна знаходитися на одній осі з порожниною 129 і каналом 128, сформованим всередині короткої стійки 120. Без попередньої обробки фільтрувальної мембрани 116 герметиком 140, оточуючі пори фільтра, тобто, пори 138a-138d і 138i-138j на Фіг. 6, залишаються відкритими і повітря протікає навколо краплі 126 та крізь фільтрувальну мембрану 116 таким чином, що крапля 126 зразка не поглинається і досить швидко фільтрується з досяганням гарного розподілу зразка з частинками 142. Іншими словами, застосування герметика 140 має перевагу, яка полягає у створенні чіткішої зовнішньої периферії 137 сліду 136 краплі 126, коли рідина починає розчиняти герметик 140, який розташований під краплею 126. Без застосування герметика 140 частинки 142 не будуть мати достатньо часу для однорідного розподілу всередині краплі 126, оскільки рідина 144 негайно починає протікати крізь пори 138 без надання частинкам 142 годинного періоду для осідання і однорідного розподілу всередині краплі 126. Однією дуже важливою ознакою герметика 140 є, таким чином, створення вакуумного стану таким чином, що формується визначений слід зразка. Точніше, без обробки герметиком 140, згідно з представленим винаходом, крапля 126 небажано сохне завдяки дифузії і випаровуванню. Це приводить до сильно неоднорідного розподілу частинок внаслідок ефектів сушіння. На подив було виявлено, що небажане випаровування може спричиняти осмотичні ефекти, які потенційно

спричиняють руйнування частинок і формування кристалів внаслідок підвищеної концентрації солі в решті краплі. Окрім того, це заважає виявленню і нумерації частинок, причиною чого є зруйновані частинки і частинки, які приховуються сольовими осадами. В представленому винаході, при нанесенні краплі 126 зразка на загерметизовану фільтрувальну мембрану 116, рідина 144 в краплі 126 зразка повільно розчиняє герметик 140 для відкривання пор 138e-138h, розташованих під краплею 126. Тому, рідина 144 швидко всмоктується крізь пори 138e-138h фільтрувальної мембрани 116 завдяки вакууму, приводячи до гарного розподілу зразка з частинками 142 на верхній поверхні фільтрувальної мембрани 116.

7. Перед нанесенням краплі 126 зразка на фільтрувальну мембрану 116, активують вакуумний пристрій 102 і тиск у вакуумній камері 104 знижують для створення на фільтрувальній мембрані 116 підсмоктувальної сили. Вакуум у вакуумній камері 104 гарантує те, що рідина 144 краплі 126 однорідно поглинається фільтрувальною мембраною 116. Комбінація застосування герметика і вакууму приводить до однорідного розподілу частинок 142 по сліду 136 на фільтрувальній мембрані 116.

8. Відповідний об'єм (типово 5 мкл) краплі 126 зразка наносять на пористу і загерметизовану фільтрувальну мембрану 116. Як вказано вище, важливо, що діаметри частинок 142 перевищують діаметр пор 138 фільтрувальної мембрани 116, і що крапля 126 не торкається країв тримача фільтра. Об'єм, більший за 5 мкл, може наноситися шляхом використання ін'єкторної системи, де або багато крапель або більші об'єми наносяться в одне і те ж місце на фільтрувальній мембрані 116. Загалом, застосування більших об'ємів мінімізує похибку відбору зразків і дозволяє аналіз менш концентрованих зразків.

9. Крапля 126 зразка поглинається фільтрувальною мембраною 116 протягом типowo 60 секунд під дією вакуумного тиску, забезпечуваного вакуумною камерою 104. Точні величини тиску можуть частково регулюватися в залежності від розміру пор, типу зразка, об'єму зразка, чистоти і в'язкості.

10. Після поглинання, фільтрувальна мембрана 116 може від'єднуватися від фільтрувального блока 112, встановленого на короткій стійці 120 з оксиду алюмінію сканувального електронного мікроскопа (SEM) (типово шляхом застосування адгезиву і провідної карбонової стрічки 122).

11. Фільтрувальна мембрана 116 з нанесеними на неї зв'язаними частинками 142 може потім покриватися напиленням, наприклад, тонкою плівкою вуглецю (типово 20 нм в товщину) з використанням вуглецевого випарника при відповідному тиску камери типowo 1×10^{-5} мбар. Напилюване покриття покращує провідність фільтрувальної мембрани 116; збільшує відношення "сигнал-шум" фільтрувальної мембрани 116 і послаблює ушкодження від електронного променя і впливи заряджання. Ця технологія часто необхідна у застосуванні для відображення фільтрувального матеріалу з використанням сканувального електронного мікроскопа (SEM). Може бути нетрадиційним застосування вуглецевого покриття, але воно забезпечує формування зображення від сканувального електронного мікроскопа (SEM) з більшою роздільною здатністю порівняно з більшим розміром частинок металевго напилення.

12. Фільтрувальна мембрана 116 може переноситися до сканувального електронного мікроскопа (SEM) і сигнал від розсіяних первинних електронів (з використанням внутрішньолінійного детектора) або вторинних електронів (як, наприклад, шляхом застосування детектора SE2) реєструється при малому збільшенні для покривання усього сліду і при великому збільшенні (типово 10000 – 30000 разів) для нумерації. Якщо використовується еталон з різною сигнатурою вторинних електронів (хоча необов'язково для визначення концентрації частинок), то частинки, які представляють цікавість, можуть розрізнятися серед еталонних частинок шляхом поєднання інформації про яскравість від різних детекторів (таких як внутрішньолінійні детектори і детектори SE2).

13. Зображення 136 з малим збільшенням (дивіться Фіг. 4B) використовуються для визначення розміру сліду краплі і розподілу усього зразка, тоді як зображення з великим збільшенням використовуються для нумерації частинок.

14. Зображення з великим збільшенням, такі як зображення 134, отримуються у сліді зразка, починаючи від краю 137, з проходженням через центр 139 і до протилежного краю краплі, для мінімізації будь-якого впливу відмінностей в розподілі частинок у сліді краплі.

15. Із зображень з малим збільшенням, таких як зображення 136, площа сліду зразка (A_{total}) обраховується шляхом проходження краю сліду. Взяті в коло пікселі підраховуються і підрахована кількість множиться на розмір пікселів.

16. Із зображень з великим збільшенням виявляють і підраховують частинки 142. Ця процедура може виконуватися шляхом ручного маркування або автоматизованого маркування шляхом використання відповідного програмного забезпечення, такого як Vironova's proprietary

software Analyzer, або будь-якого іншого відповідного програмного забезпечення для аналізу зображень. Середня кількість частинок на одиницю площі (n/A_{FOV}) обраховується з набору даних зображення.

17. Кількість частинок на мл в зразку з частинками переважно обраховують з використанням наступної формули:

$$C = A_{total} \times \frac{n}{A_{FOV}} \times df \times \frac{1000 \mu l}{V \mu l}$$

де C є концентрацією частинок, df є коефіцієнтом розрідження, а V є нанесеним об'ємом зразка. Також може бути можливим використовувати формулу, в якій взято до уваги той факт, що розподіл частинок може змінюватися від периферії зразка з частинками, коли зразок сканується, в напрямі до його центру.

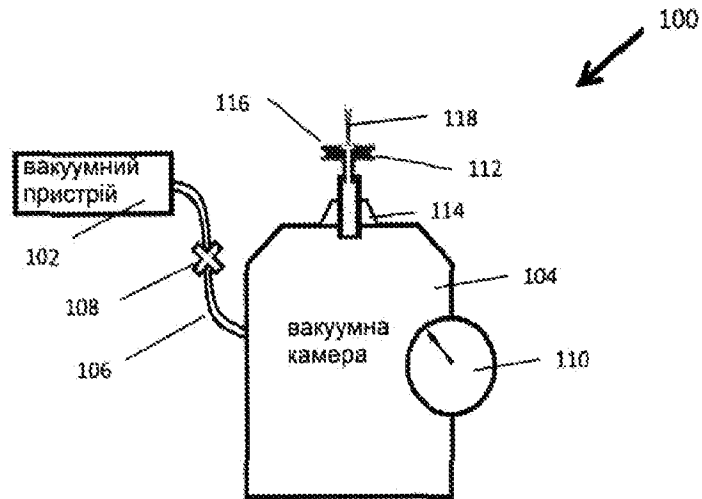
Таким чином, технологія квантифікаційної сканувальної електронної мікроскопії частинок (pqSEM) представленого винаходу є технологією високоточної безпосередньої детекції і нумерації частинок. Важливою ознакою представленого винаходу є те, що пряма детекція не залежить від спорідненості між пробєю і зразком, що можуть робити багато існуючих традиційних технологій. Усі параметри, такі як коефіцієнт розрідження, нанесений об'єм, слід краплі, можуть контролюватися і кількість частинок на одиницю площі може безпосередньо визначатися з одночасною мінімізацією похибки з наближень і припущень. Більше того, роздільна здатність pqSEM дозволяє детекцію окремих невидимих неозброєним оком частинок в кластерах і з однакового зразка можуть нумеруватися дві популяції частинок різних розмірів або інші морфологічні ознаки. Частинки і слід з висококонтрастних зображень, одержаних технологією pqSEM представленого винаходу, можуть легко виявлятися шляхом використання автоматизованого аналізу зображень. Це надає засіб для швидкого збору великих наборів даних і одержання стійких статистичних результатів.

Хоча представлений винахід був описаний у відповідності з переважними прикладами і варіантами виконання, слід розуміти, що в нього можуть вноситися певні заміни і зміни без виходу за рамки наступної формули винаходу.

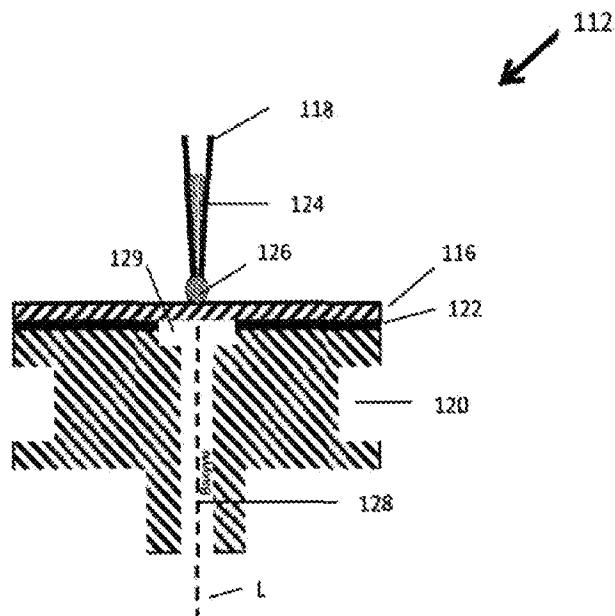
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб квантифікації невидимих неозброєним оком частинок, у якому: використовують фільтрувальну мембрану (116), яка має сформовані в ній пори (138), функціонально з'єднують її з вакуумною камерою (104); герметизують пори герметиком (140); наносять краплю (126) зразка, яка містить рідину (144) і невидимі неозброєним оком частинки (142), на фільтрувальну мембрану (116) без торкання краплею (126) зразка жодного зовнішнього краю фільтрувальної мембрани (116); рідина (144) розчиняє герметик (140) в порах (138e-138h), розташованих під краплею (126) зразка; рідина (144) протікає крізь пори, у яких був розчинений герметик (140), а невидимі неозброєним оком частинки (142) залишаються на верхній поверхні фільтрувальної мембрани (116); і невидимі неозброєним оком частинки (142) нумерують в електронній мікроскопії.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково попередньо встановлюють фільтрувальний блок (112), який містить фільтрувальну мембрану (116), на предметний столик (120) сканувального електронного мікроскопа (SEM).
3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково на предметний столик (120) сканувального електронного мікроскопа (SEM) поміщають монтажну стрічку (122).
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково використовують предметний столик (120) сканувального електронного мікроскопа (SEM), який має сформований в ньому продовгуватий канал (128), використовують ін'єктор (118), який містить краплю (126) зразка, і орієнтують ін'єктор (118) на верхній частині продовгуватого каналу (128) перед поміщенням краплі (126) зразка на фільтрувальній мембрані (116).
5. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково з'єднують предметний столик (120) сканувального електронного мікроскопа (SEM) з вакуумною камерою (104), з'єднаною з вакуумним пристроєм (102), і піддають фільтрувальну мембрану (116) дії підсмоктувальної сили за допомогою продовгуватого каналу (128).
6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково рідина (144) розчиняє герметик (140) тільки в порах (138e-138h), розташованих безпосередньо під краплею (126) зразка, тоді як сусідні пори (138a-138d, 138i-138j) залишаються загерметизованими герметиком (140).

7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково невидимі неозброєним оком частинки (142) формують слід (136) на фільтрувальній мембрані (116), і сканують невидимі неозброєним оком частинки (142) від зовнішньої периферії (137) сліду (136) в напрямі до центра (139) сліду (136).
- 5 8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково використовують розріджувач рідини (144) для розчинення герметика (140) в порах, розташованих безпосередньо під краплею (126) зразка.
9. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у ньому додатково як герметик (140) використовують гліцин.



Фіг. 1



Фіг. 2

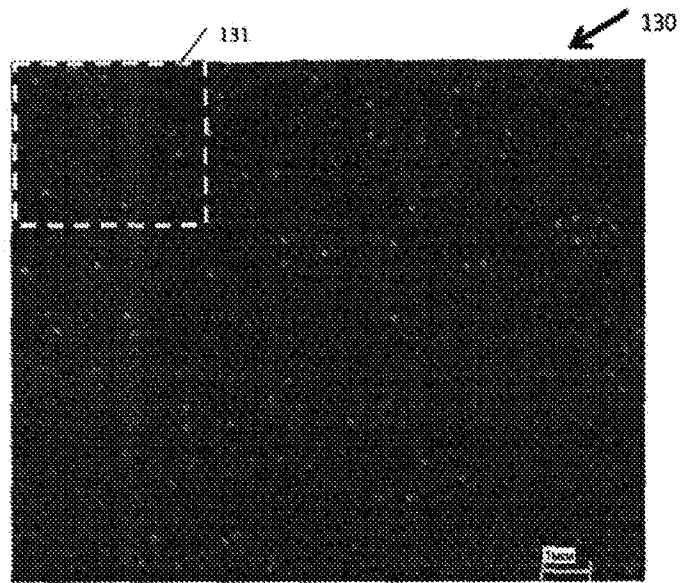


Fig. 3A

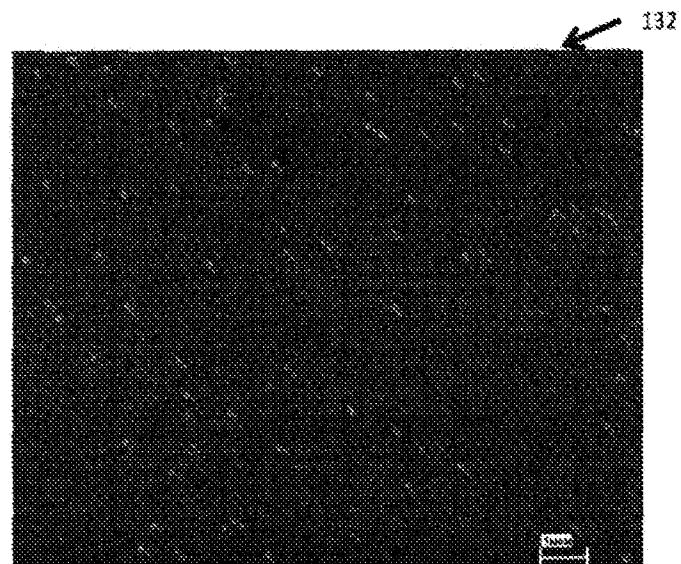


Fig. 3B

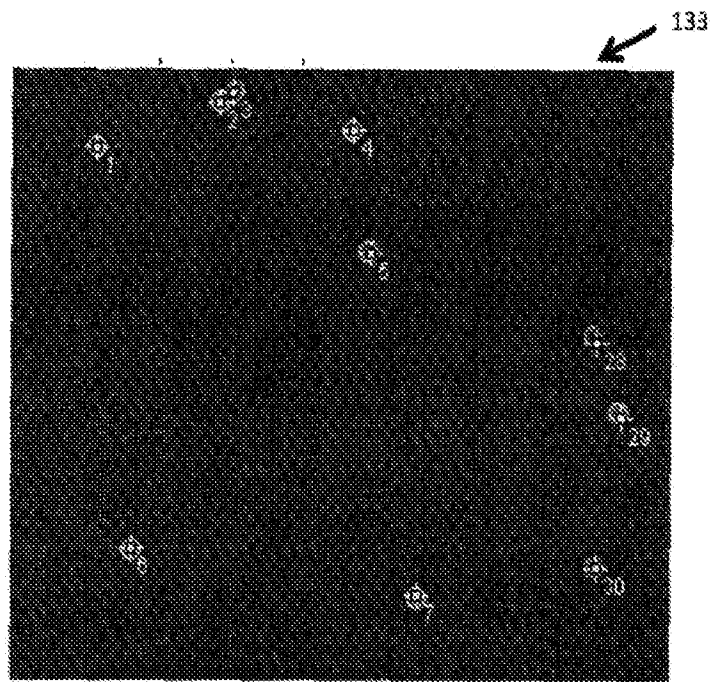


Fig. 3C

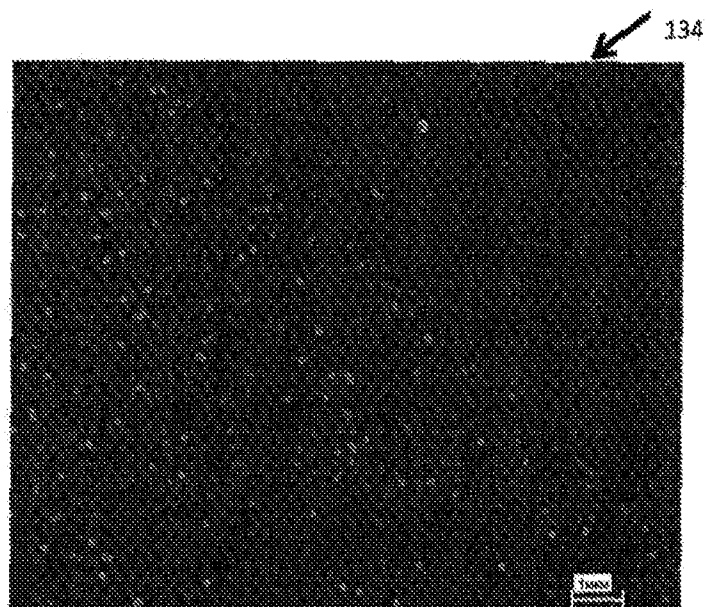


Fig. 4A

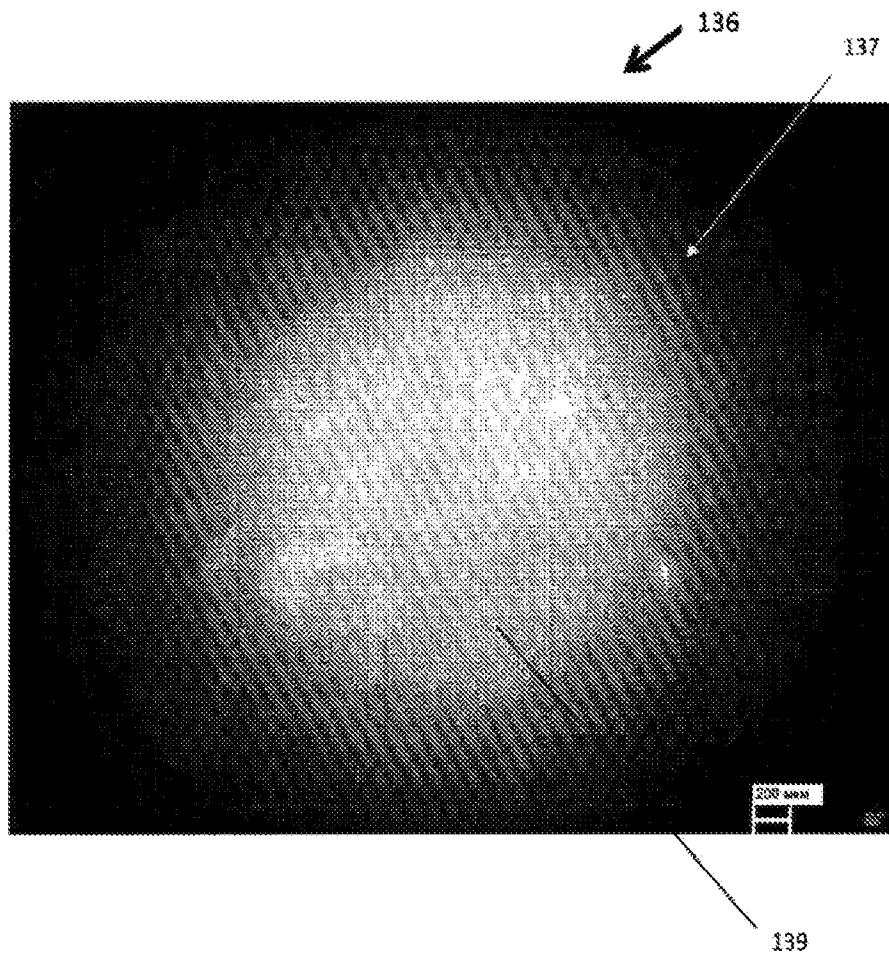


Fig. 4B

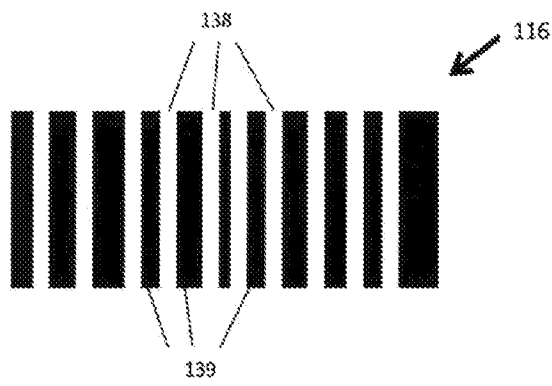


Fig. 5A

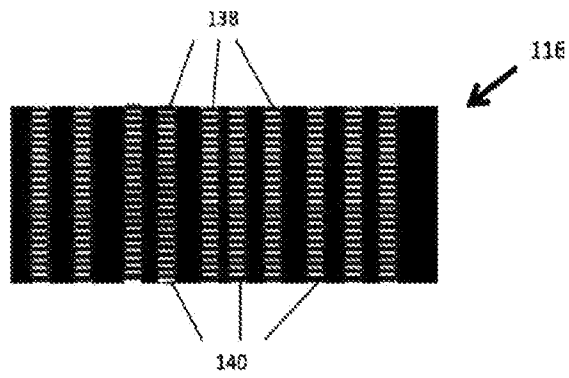


Fig. 5B

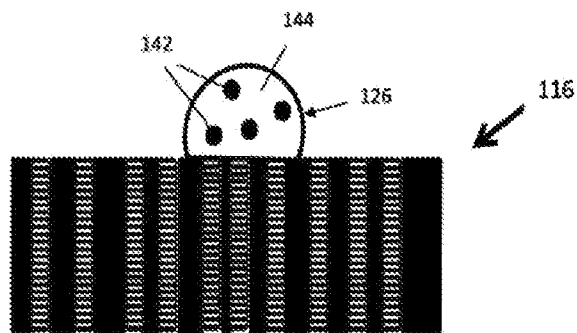


Fig. 5C

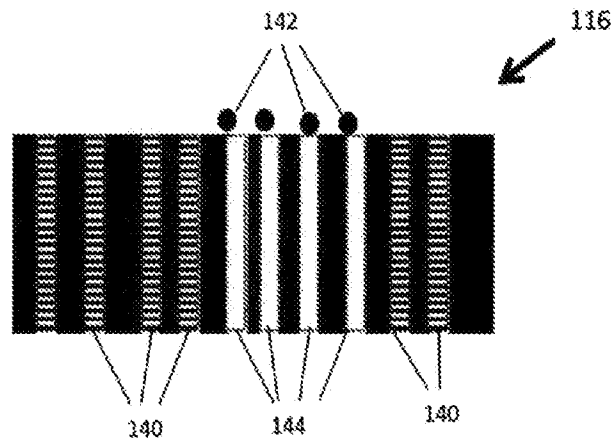


Fig. 5D

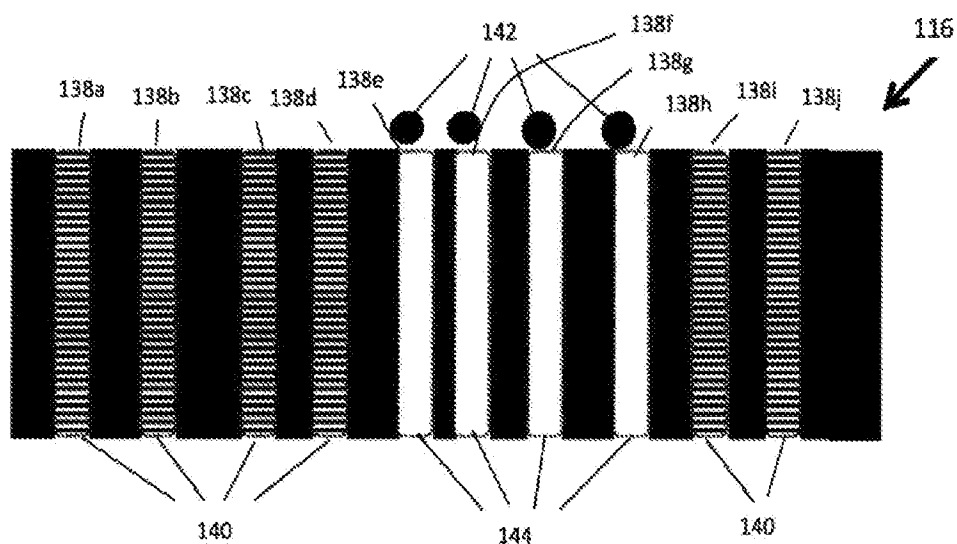


Fig. 6