



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012153386/15, 11.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.12.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.12.2012

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2014 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 10.06.2015 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **НОВИЦКИЙ Н.Н. Свойства металлических пленок и наноструктур, полученных методом ионно-лучевого распыления. Автореферат. Минск 2003, стр.10. RU 2136467 C1, 10.09.1999. RU 2267787 C2, 10.01.2006. RU 2335735 C1, 10.10.2008. ЯМИНСКИЙ И. и др. Новые разработки в области зондовой литографии углеродных материалов// Наноиндустрия. N2. 2009, с. 28-30. (см. прод.)**

Адрес для переписки:

119311, Москва, ул. Строителей, 4-5-47, ООО
"Медицинские нанотехнологии"

(72) Автор(ы):

**Яминский Игорь Владимирович (RU),
Горелкин Петр Владимирович (RU),
Ерофеев Александр Сергеевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Общество с ограниченной ответственностью
"Медицинские нанотехнологии" (RU)**

(54) СПОСОБ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНО- И МИКРООБЪЕКТОВ МЕТОДОМ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области зондовой микроскопии. Сущность способа исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии состоит в том, что объект помещают на пористую подложку, фиксируют на поверхности подложки и сканируют зафиксированный объект методом зондовой микроскопии. Используют подложку со сквозными порами, размер которых менее размера исследуемого объекта, а фиксацию объекта осуществляют ламинарным потоком

жидкости или газа, подаваемым на подложку со стороны, подлежащей сканированию, причем величина прижимной силы, действующей со стороны потока на объект, находится в диапазоне 10^{-12} - 10^{-3} ньютон. Использование заявленного способа позволяет исследовать структуры и механические свойства объектов органической и неорганической природы, повышать его информативность для исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии. 7 пр.

(56) (продолжение):

ВАСИЛЬЕВ С.Ю. Туннельная микроскопия/спектроскопия гетерогенных электродных и электроосажденных материалов. Автореферат. Москва.2010



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 552 296** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

G01N 33/00 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012153386/15**, 11.12.2012

(24) Effective date for property rights:
11.12.2012

Priority:

(22) Date of filing: **11.12.2012**

(43) Application published: **20.06.2014** Bull. № 17

(45) Date of publication: **10.06.2015** Bull. № 16

Mail address:

**119311, Moskva, ul. Stroitelej, 4-5-47, OOO
"Meditsinskie nanotekhnologii"**

(72) Inventor(s):

**Jaminskij Igor' Vladimirovich (RU),
Gorelkin Petr Vladimirovich (RU),
Erofeev Aleksandr Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Meditsinskie nanotekhnologii" (RU)**

(54) **METHOD OF NANO AND MICRO OBJECT STUDY BY PROBE MICROSCOPY**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: object is positioned on porous substrate, fixed to the substrate surface and scanned by probe microscopy method. Substrate with through pores of smaller size than the diameter of a study object is used, and an object is fixated by laminar flow of liquid or gas supplied to the substrate from the side of

scanning, with clamping force exerted by the flow on an object within 10^{-12} - 10^{-3} N range.

EFFECT: possible study of structures and mechanical properties of organic and inorganic objects, enhanced information content of nano and micro object studies by probe microscopy.

7 ex

R U 2 5 5 2 2 9 6 C 2

R U 2 5 5 2 2 9 6 C 2

Изобретение относится к области зондовой микроскопии и может быть использовано для исследования структуры и механических свойств объектов органической и неорганической природы.

Известен способ исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии путем помещения объекта на подложку, его фиксации на поверхности подложки с помощью электростатических сил и сканирования зафиксированного объекта методом зондовой микроскопии (Rikke Louise Meyer, Xingfei Zhou, Lone Tang, Ayyoob Arpanaei, Peter Kingshott, Flemming Besenbacher. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions // Ultramicroscopy (2010), p.1-8).

Известен способ исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии путем помещения объекта на подложку, его химической фиксации на поверхности подложки и сканирования зафиксированного объекта методом зондовой микроскопии (Rikke Louise Meyer, Xingfei Zhou, Lone Tang, Ayyoob Arpanaei, Peter Kingshott, Flemming Besenbacher. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions // Ultramicroscopy (2010), p.1-8).

Наиболее близким к заявляемому является известный способ исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии путем помещения объекта на пористую подложку, его фиксации на поверхности подложки и сканирования зафиксированного объекта методом зондовой микроскопии (L.Kailas, E.C.Ratcliffe, E.J.Hayhurst, M.G.Walker, S.J.Foster, J.K.Hobbs, Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes // Ultramicroscopy 109 (2009), p.775-780) - прототип. В данном способе исследуемый объект (бактерию) помещают в среде воды на поверхность пористой подложки из диоксида кремния, не содержащей сквозных пор, дают возможность воде испариться, в результате чего исследуемый объект фиксируется на поверхности подложки, после чего подложку помещают в измерительную ячейку с жидкостью и проводят сканирование зафиксированного объекта методом зондовой микроскопии.

Недостатком известного способа является его трудоемкость, заключающаяся в многостадийной подготовке подложки с образцом перед его сканированием зондовым микроскопом и недостаточная информативность способа, не позволяющая изучать изменение свойств объекта в зависимости от варьируемых параметров среды, в которой проводят измерения.

Техническая задача изобретения заключается в снижении трудоемкости способа, повышении его информативности и расширении арсенала технических средств, которые могут быть использованы для исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии.

Указанный технический результат достигается тем, что в известном способе исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии путем помещения объекта на пористую подложку, его фиксации на поверхности подложки и сканирования зафиксированного объекта методом зондовой микроскопии, используют подложку со сквозными порами, размер которых менее размера исследуемого объекта, а фиксацию объекта осуществляют ламинарным потоком жидкости или газа, подаваемым на подложку со стороны, подлежащей сканированию, причем величина прижимной силы, действующей со стороны потока на объект, находится в диапазоне 10^{-12} - 10^{-3} ньютон (Н).

Предлагаемый способ является новым и не описан в научно-технической литературе.

Данный способ может быть использован для исследования методом зондовой микроскопии нано- и микрообъектов органической и неорганической природы. При этом размеры исследуемых объектов могут составлять от 1 нанометра (нм) до 100

микрометров (мкм). В качестве таких объектов могут быть использованы, например, вирусы, бактерии, нано- и микрочастицы неорганических материалов и т.д.

Предлагаемое техническое решение может быть использовано для исследования объектов различными методами зондовой микроскопии, например, такими как атомно-силовая микроскопия, ближнепольная микроскопия, сканирующая туннельная микроскопия и т.д.

В данном техническом решении могут быть использованы различные органические и/или неорганические жидкости, например, такие как спирт, хлороформ, ацетон, вода, водно-солевые растворы, физиологические жидкости и т.д., а также различные газы, например, такие как воздух, углекислый газ, азот, кислород и т.д. Можно использовать как индивидуальные жидкости или газы, так и смеси жидкостей или газов.

В предлагаемом способе могут быть использованы пористые подложки, изготовленные из различных органических или неорганических материалов, например, таких как полимеры, диоксид кремния, кремний, оксид алюминия и т.д. Следует отметить, что используемые подложки обязательно должны иметь сквозные поры, размер которых должен быть менее размера исследуемого объекта, причем форма пор может быть практически любой. Поры могут быть как одинаковыми по размеру, так и разными. Такие подложки описаны в научно-технической литературе. [Shashishekar P. Adiga, Chunmin Jin, Larry A. Curtiss, Nancy A. Monteiro-Riviere and Roger J. Narayan. Nanoporous membranes for medical and biological applications \\\ WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, V. №1, 2009, p.568-581]. Если в предложенном техническом решении использовать пористые подложки не со сквозными порами или со сквозными порами, размер которых будет совпадать либо превышать размер исследуемых объектов, то предлагаемое изобретение становится неработоспособным.

Следует отметить, что фиксацию исследуемого объекта на поверхности пористой подложки обязательно надо осуществлять перед проведением микроскопических исследований, если объект не закреплять, то изучать объект методами зондовой микроскопии не удастся.

В предлагаемом техническом решении фиксацию исследуемого объекта на поверхности пористой подложки осуществляют ламинарным потоком среды, подаваемым на подложку со стороны, подлежащей сканированию. Следует отметить, что поток среды обязательно должен быть ламинарным. При использовании турбулентного потока среды предлагаемое техническое решение будет неработоспособным. Если ламинарный поток среды будет подаваться на подложку со стороны, противоположной сканированию, то техническое решение также будет неработоспособным.

Экспериментально было установлено, что в предложенном изобретении величина прижимной силы, действующей со стороны потока на объект, должна находиться в диапазоне 10^{-12} - 10^{-3} Н. Если поток будет оказывать прижимную силу, превышающую 10^{-3} Н, то он будет вызывать критичный изгиб кантилевера зондового микроскопа, который не позволит проводить сканирование исследуемого объекта иглой кантилевера. Величина прижимной силы может быть определена известным способом [J. Zlatanova, S.M. Lindsay, S.H. Leuba. «Single Molecule Force Spectroscopy in Biology Using the Atomic Force Microscope», Prog. Biophys. Mol. Biol, 74, 37, (2000)] путем химического прикрепления силатранных групп линкера [молекулярный фрагмент, ковалентно связанный с твердой подложкой, который содержит реакционноспособные функциональные группы] к игле кремниевого кантилевера зондового микроскопа. При этом другие функциональные группы линкера способны ковалентно связываться с поверхностью исследуемого

объекта. В качестве линкера могут быть использованы такие химические соединения, например, как 1- ω -меркаптополиметиленилсилатран, 1- ω -аминополиметиленилсилатран и т.д. После этого проводят сканирование исследуемого объекта с помощью модифицированного кантилевера и осуществляют снятие силовых кривых для 10
 5 одинаковых исследуемых объектов, по которым определяют среднюю силу отрыва объекта от поверхности в присутствии и в отсутствии потока жидкости или газа. Разность определенных сил отрыва равна прижимной силе потока.

В предлагаемом изобретении фиксировать исследуемые объекты на поверхности пористой подложки можно двумя способами, первый из которых заключается в
 10 помещении объекта в чистом виде или в виде суспензии на пористую подложку с последующей подачей ламинарного потока жидкости или газа. Второй способ заключается во внесении исследуемого объекта непосредственно в ламинарный поток жидкости или газа.

В предлагаемом техническом решении можно варьировать скорость потока жидкости или газа, а также другие параметры жидкости или газа, например, такие как
 15 концентрация растворенных веществ, температура и т.д., по ходу эксперимента. В последнем случае можно изучать изменение свойства объекта в зависимости от изменения параметров потока, что повышает информативность способа.

После окончания экспериментов используемые мембраны могут быть освобождены
 20 от исследуемых объектов путем подачи противотока жидкости или газа и повторно использованы в других опытах.

Преимущества предложенного технического решения иллюстрируют следующие примеры.

Пример 1

Опыт проводят с использованием жидкостной ячейки атомно-силового микроскопа,
 25 содержащей мембрану из оксида кремния, имеющую площадь $1 \times 1 \text{ см}^2$. Используемая мембрана имеет толщину 1 мкм и содержит сквозные поры цилиндрической формы диаметром 150 нм со средним расстоянием между порами 200 нм. С помощью шприцевой
 30 помпы создают ламинарный поток буфера марки Трис-HCl (pH 7,5, 0,01 М) через пористую мембрану. Затем в ламинарный поток добавляют исследуемый вирус табачной мозаики, имеющей размер 300 нм, взятый в концентрации 1 микрограмм/мл в буфере Трис-HCl. В результате прохождения ламинарного потока буфера, содержащего вирусы
 35 табачной мозаики, через пористую мембрану, на ее поверхности фиксируют в одном положении вирусы за счет прижимной силы ламинарного потока буфера, равной 10^{-3} Н. После чего производят сканирование вирусов табачной мозаики, зафиксированных на поверхности мембраны, с помощью атомно-силового микроскопа марки Nanoscope и изучают морфологию поверхности вируса с пространственным разрешением 4 нм.

Пример 2

Опыт проводят с использованием жидкостной ячейки ближнепольного микроскопа
 40 марки Certus NSOM, содержащей пористую мембрану из оксида алюминия, имеющую площадь $2 \times 2 \text{ см}^2$. Используемая мембрана имеет толщину 1 мкм и содержит сквозные поры квадратной формы (сторона квадрата 500 нм) со средним расстоянием между порами 600 нм. На мембрану наносят суспензию бактерий *Acinetobacter baumannii* в
 45 бидистиллированной воде с концентрацией 2 микрограмм/мл. С помощью шприцевой помпы создают циркулирующий ламинарный поток бидистиллированной воды через мембрану со стороны, подлежащей сканированию. В результате прохождения ламинарного потока воды через пористую мембрану на ее поверхности фиксируют в

одном положении бактерии за счет прижимной силы потока, равной 10^{-6} Н. После этого производят сканирование бактерий, зафиксированных на поверхности мембраны. Для изучения влияния антибиотика колистина на структуру поверхности бактерий в ламинарный поток, циркулирующий через мембрану, вводят данный антибиотик, при этом концентрацию антибиотика варьируют от 0,5 до 32 микрограмм/мл. В результате эксперимента была изучена морфология поверхности бактерии с пространственным разрешением 2 нм в зависимости от концентрации антибиотика колистина, что говорит о высокой информативности способа.

Пример 3

Опыт проводят аналогично примеру 1, однако в качестве подложки используют поликарбонатную мембрану со средним диаметром сквозных пор 20 нм и средним расстоянием между порами 30 нм, а вместо потока жидкости используют ламинарный поток газообразного азота, в качестве сканирующего зондового микроскопа используют туннельный микроскоп марки FemtoScan, РФ, а в качестве исследуемого объекта используют золотые сферические частицы, диаметр которых составляет 30 нм. При этом величина прижимной силы, действующей со стороны потока газа на объект, составляет 10^{-12} Н. В ходе эксперимента изучают морфологию поверхности частиц золота с пространственным разрешением 1 нм.

Пример 4

Опыт проводят аналогично примеру 3, однако вместо газообразного азота используют воздух, ламинарный поток которого создает прижимную силу, равную 10^{-10} Н. В ходе эксперимента изучают морфологию поверхности частиц золота с пространственным разрешением 1 нм.

Пример 5

Опыт проводят аналогично примеру 3, однако вместо газообразного азота используют аргон, ламинарный поток которого создает прижимную силу, равную 10^{-11} Н. В ходе эксперимента изучают морфологию поверхности частиц золота с пространственным разрешением 1 нм.

Пример 6

Опыт проводят аналогично примеру 3, однако вместо ламинарного потока газообразного азота используют ламинарный поток хлороформа, который создает прижимную силу, равную 10^{-8} Н. Однако вместо туннельного микроскопа используют атомно-силовой микроскоп марки Nanoscope. В ходе эксперимента изучают морфологию поверхности частиц золота с пространственным разрешением 2 нм.

Пример 7

Опыт проводят аналогично примеру 6, однако вместо ламинарного потока хлороформа используют ламинарный поток 70%-ого водного раствора этилового спирта, который создает прижимную силу, равную 10^{-9} Н. В ходе эксперимента изучают морфологию поверхности частиц золота с пространственным разрешением 2 нм.

Таким образом, из приведенных примеров видно, что предложенный способ достаточно прост и действительно существенно снижает трудоемкость известного способа исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии, повышает его информативность и расширяет арсенал технических средств, которые могут быть использованы для исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии.

Формула изобретения

Способ исследования нано- и микрообъектов методом зондовой микроскопии путем помещения объекта на пористую подложку, его фиксации на поверхности подложки и сканирования зафиксированного объекта методом зондовой микроскопии, отличающийся тем, что используют подложку со сквозными порами, размер которых менее размера исследуемого объекта, а фиксацию объекта осуществляют ламинарным потоком жидкости или газа, подаваемым на подложку со стороны, подлежащей сканированию, причем величина прижимной силы, действующей со стороны потока на объект, находится в диапазоне 10^{-12} - 10^{-3} ньютон.