

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034343**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.29

(21) Номер заявки
201700166

(22) Дата подачи заявки
2016.12.30

(51) Int. Cl. **G01Q 60/38** (2010.01)
G01Q 70/08 (2010.01)
B82Y 35/00 (2011.01)

(54) **СПОСОБ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НА АТОМНО-СИЛОВОМ
МИКРОСКОПЕ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРОФОРОВ-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ**

(43) **2018.07.31**

(96) **2016000121 (RU) 2016.12.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (RU)**

(56) **RU-C1-2425386
US-A1-20100306888
WO-A1-2005006347**

(72) Изобретатель:
**Петров Александр Борисович,
Бахтизин Рауф Загидович, Гоц Сергей
Степанович (RU)**

(57) Изобретение относится к области техники зондовой микроскопии. Технический результат предлагаемого изобретения заключается в упрощении используемой экспериментальной техники, с одной стороны, за счет упрощения оптической схемы возбуждения и регистрации фотонов и в переносе методов классического люминесцентного анализа на нанометровый уровень, с другой стороны. Такой перенос позволяет точно позиционировать положение флуоресцентного зонда над исследуемым образцом, соответственно становится возможным делать локальный химический анализ, а также изучать резонансный перенос энергии при люминесценции во взаимосвязи с особенностями строения поверхности изучаемого образца.

B1

034343

034343

B1

Изобретение относится к области приборостроения, преимущественно к измерительной технике. Оно может быть использовано, например, в молекулярной биологии, для исследования механизмов миграции энергии в исследуемом образце, при исследовании химического состава образцов с нанометровым пространственным разрешением, для изучения вязкоупругих и электрофизических свойств исследуемой поверхности в зависимости от химического состава.

Известен такой способ исследования объектов, как люминесцентный анализ [М.А. Константинова-Шлезингер. Люминесцентный анализ. М., Гос. Изд. Физ.-мат. Лит., 1961, 400 с.]. Чаще всего используют флуоресценцию. При таком способе исследования к раствору изучаемого вещества добавляют специальные вещества, называемые флуоресцентными индикаторами или флуорофорами. В свою очередь, флуорофоры подразделяют на флуоресцентные метки или флуоресцентные зонды в зависимости от того, как они связываются с молекулой-мишенью, ковалентной связью или нековалентной. После этого флуорофоры возбуждают с помощью внешних источников излучения и далее изучают свойства испускаемого флуоресцентного излучения. К числу изучаемых особенностей флуоресцентного излучения относятся время флуоресценции, анизотропия, спектры, кинетика флуоресценции, поляризация излучения и другие характеристики. Изучение спектров флуоресценции позволяет изучать химический состав образцов, как качественный, так и количественный, также механизмы межмолекулярной и внутримолекулярной миграции энергии и другие вопросы.

К недостаткам люминесцентного анализа можно отнести
низкое пространственное разрешение;

невозможность связать полученные результаты с какими-либо характерными структурными особенностями строения исследуемого образца без дополнительных исследований.

Известен также способ исследования объектов, называемый флуоресцентной микроскопией. В рамках этого метода какие-то интересующие исследователя элементы (молекулы, клетки и т.д.) помечаются специфическими флуоресцентными метками или флуоресцентными зондами. Далее объект сканируется лучом лазера, заставляющего эти метки флуоресцировать. После этого может быть построено изображение исследуемого объекта, содержащего флуоресцентные метки, которые показывают пространственное распределение интересующих исследователя элементов и то, как с течением времени это распределение меняется. Также может быть исследовано время флуоресценции, анизотропия, спектры и кинетика флуоресценции, могут быть использованы и более сложные методы анализа с использованием флуоресценции (Optical Fluorescence Microscopy: From the Spectral to the Nano Dimension Summary, ed. By A.Diaspro, Springer, 2011; Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. 1986, 488).

К недостаткам такого способа исследования с помощью флуоресценции относятся
низкое разрешение без использования сверхразрешения;

невозможность управлять положением флуоресцентной метки при использовании сверхразрешения.

Наиболее близким аналогом по технической сущности и достигаемому результату является способ возбуждения и регистрации оптических фононов в игле кантилевера атомно-силового микроскопа (АСМ) [Петров А.Б., Бахтизин Р.З., Гоц С.С. Способ возбуждения и регистрации оптических фононов, патент № 2579360], который позволяет возбуждать и регистрировать оптические фононы на острие иглы кантилевера АСМ непосредственно вблизи исследуемой поверхности, а за счет тесной механической связи острия иглы кантилевера с исследуемой поверхностью исследовать спектры оптических фононов исследуемого образца.

К недостаткам такого способа возбуждения и регистрации оптических фононов в игле кантилевера АСМ относятся

довольно сложная экспериментальная техника, предполагающая использование фемтосекундного лазера;

ограниченный функционал, позволяющий экспериментатору работать только с оптическими фононами.

Технический результат предлагаемого изобретения заключается в упрощении используемой экспериментальной техники, с одной стороны, за счет упрощения оптической схемы возбуждения и регистрации фотонов и в переносе методов классического люминесцентного анализа на нанометровый уровень, с другой стороны. Такой перенос позволяет точно позиционировать положение флуоресцентного зонда над исследуемым образцом, соответственно становится возможным делать локальный химический анализ, а также изучать резонансный перенос энергии при люминесценции во взаимосвязи с особенностями строения поверхности изучаемого образца.

Указанный технический результат достигается тем, что способ люминесцентного анализа на атомно-силовом микроскопе с помощью флуорофоров-флуоресцентных зондов, включающий облучение лазером активного слоя материала, нанесенного на острие иглы кантилевера, прижатой к исследуемому образцу, возбуждение и регистрацию в нем оптических фононов, обработку полученной информации, отличающийся тем, что в качестве слоя материала, нанесенного на острие иглы кантилевера, служит флуорофор-флуоресцентный зонд, взаимодействующий с исследуемой поверхностью с образованием нековалентной химической связи, в котором возбуждаются электроны с помощью источника оптического излучения, далее излучается флуоресцентное излучение, которое регистрируется с помощью фотопри-

емного устройства, сфокусированного на острие иглы кантилевера, полученная информация обрабатывается, и на основании характеристик флуоресцентного излучения делается вывод о свойствах исследуемого образца в точке контакта иглы кантилевера с ним.

При флуоресценции в точке контакта иглы кантилевера с изучаемым образцом протекают следующие физические процессы. После возбуждения флуорофора-флуоресцентного зонда, который служит донором, возможны три варианта поведения возбужденного состояния. В первом варианте происходит резонансный перенос энергии от флуорофора, выступающего донором, к исследуемому образцу, выступающему акцептором, после чего акцептор высвечивает флуоресцентное излучение. Во втором случае происходит резонансный перенос энергии от флуорофора, выступающего донором, к исследуемому образцу, выступающему акцептором, после чего происходит безызлучательная диссипация энергии акцептора, т.е. происходит гашение флуоресценции. И в третьем случае резонансного переноса энергии не происходит, в этом случае акцептор сам высвечивает флуоресцентное излучение.

Использование набора кантилеверов с разными флуоресцентными зондами позволит изучать химическое строение поверхности даже при отсутствии априорной информации о химическом составе исследуемого образца. В настоящий момент существует большое количество флуоресцентных зондов, разработанных для люминесцентного анализа [И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк, В.В. Межевикин и др. Фотобиофизика. Красноярск : ИПК СФУ, 2008, с. 438]. Приведем несколько примеров. Для изучения белков и липидов могут использоваться нафтиламинсульфоновые кислоты. Аминокислота тирозин способна к фотолюминесценции в оптическом диапазоне, соответственно можно использовать флуоресцентные зонды, прикрепленные к кантилеверу АСМ для тушения флуоресценции тирозина. Кроме того, существуют флуоресцентные зонды, флуоресцентное излучение которых зависит не только от химического состава окружающей среды, но и от рН, от вязкости окружающей среды, от значения локального электрического поля.

Отличительным признаком предложенного способа является использование флуоресцентного излучения, генерируемого флуоресцентным зондом - донором, закрепленным на острие иглы кантилевера, после его возбуждения источником оптического излучения, или исследуемым образцом - акцептором, после его возбуждения за счет резонансного переноса энергии. Благодаря тому, что флуоресцентный зонд размещен на острие иглы кантилевера, появляется возможность точно позиционировать его размещение на исследуемой поверхности.

Примеры технической реализации заявляемого метода.

Схема устройства для исследования поверхности на АСМ с помощью флуоресцентных зондов изображена на чертеже. Устройство включает источник оптического излучения 1, кантилевер 2, иглу кантилевера 3, острие иглы кантилевера 4, молекулярные цепочки 5 с донором 6, составляющие флуоресцентный зонд и связанные ковалентной связью с иглой кантилевера и нековалентной связью с изучаемой поверхностью, акцептор 7, входящий в состав исследуемого образца 9, и систему регистрации флуоресцентного излучения 8.

Способ люминесцентного анализа на атомно-силовом микроскопе с помощью флуорофоров-флуоресцентных зондов реализуется следующим образом (см. чертеж). Источник оптического излучения 1 генерирует оптический импульс, возбуждающий флуоресцентный зонд, закрепленный с помощью ковалентных химических связей на острие иглы кантилевера 4 и прижатый к исследуемому образцу 9. Возбужденное состояние флуоресцентного зонда с помощью резонансного переноса энергии переносится от донорного центра 6, входящего в состав флуоресцентного зонда, к акцепторному центру 7, входящему в состав исследуемого образца, и далее высвечивается в виде флуоресцентного излучения, которое регистрируется системой регистрации 8. Характеристики флуоресцентного излучения зависят от свойств акцептора и его ближайшего окружения на поверхности. Таким образом, изучая характеристики флуоресцентного излучения, можно изучать резонансный перенос энергии в окрестности острия иглы кантилевера. Перемещая флуоресцентный зонд из одного места в другое с помощью кантилевера, мы можем получать изображение поверхности для различных характеристик флуоресцентного излучения. На чертеже не изображены ситуации, когда происходит тушение флуоресцентного излучения зонда и когда резонансного переноса энергии не возникает.

Получение спектров флуоресцентного излучения (а также исследование его других характеристик, таких как время флуоресценции, анизотропия, спектры и кинетика и т.д.), совмещенного с 3-D изображением зондового микроскопа, позволит ответить на многие актуальные вопросы физики конденсированных сред, химии, биологии, медицины.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ люминесцентного анализа на атомно-силовом микроскопе, включающий облучение лазером слоя материала, нанесенного на острие иглы кантилевера, прижатой к исследуемому образцу, возбуждение и регистрацию в нем оптических фононов, обработку полученной информации, отличающийся тем, что в качестве активного слоя материала используется слой молекулярных цепочек флуорофоров, связанных ковалентной связью с иглой кантилевера, при этом флуоресцентный зонд взаимодействует с ис-

следуемой поверхностью с образованием нековалентной химической связи, в котором возбуждают электроны с помощью источника оптического излучения, далее излучаемое флуоресцентное излучение регистрируется с помощью фотоприемного устройства, сфокусированного на острие иглы кантилевера, а полученная информация обрабатывается, и на основании характеристик флуоресцентного излучения делается вывод о свойствах исследуемого образца в точке контакта иглы кантилевера с ним.

