

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 181921

ОПТИЧЕСКИ-ПРОЗРАЧНАЯ ПОДЛОЖКА С СЕТКОЙ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООБЪЕКТОВ

Патентообладатель: *Степанов Андрей Львович (RU)*

Авторы: *Степанов Андрей Львович (RU), Нуждин Владимир Иванович (RU), Валеев Валерий Фердинандович (RU), Сальников Вадим Владимирович (RU), Евтюгин Владимир Геннадиевич (RU), Воробьев Вячеслав Валерьевич (RU), Осин Юрий Николаевич (RU)*

Заявка № 2017123162

Приоритет полезной модели 29 июня 2017 г.

Дата государственной регистрации в
Государственном реестре полезных
моделей Российской Федерации 26 июля 2018 г.

Срок действия исключительного права
на полезную модель истекает 29 июня 2027 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/48 (2006.01); C12Q 1/02 (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2017123162, 29.06.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2017

Дата регистрации:
26.07.2018

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 29.06.2017

(45) Опубликовано: 26.07.2018 Бюл. № 21

Адрес для переписки:
420081, г. Казань, ул. Курская, 25, кв. 14,
Степанов А.Л.

(72) Автор(ы):

Степанов Андрей Львович (RU),
Нуждин Владимир Иванович (RU),
Валеев Валерий Фердинандович (RU),
Сальников Вадим Владимирович (RU),
Евтюгин Владимир Геннадиевич (RU),
Воробьев Вячеслав Валерьевич (RU),
Осин Юрий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Степанов Андрей Львович (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 03087291 A2, 23.10.2003. LIU C.X. et al. Ion-Implanted Glass Waveguides: a Review // Physics International, 2013, V.4, pp.1-12. OZTARHAN A. et al. Metal vapour vacuum arc ion implantation facility in Turkey // Surface and Coatings Technology, 2005, V.196, pp.327- 332. SOKULLU-URKAC E. et al. Neural Cell Attachment on Metal Ion Implanted Glass (см. прод.)

(54) ОПТИЧЕСКИ-ПРОЗРАЧНАЯ ПОДЛОЖКА С СЕТКОЙ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООБЪЕКТОВ

(57) Реферат:

Полезная модель относится к области биофизики, клеточной и молекулярной биологии, а именно к устройствам и приспособлениям для выполнения статистического анализа и исследования микрообъектов, а именно, к счетным устройствам (сеткам), состоящим из периодических микроструктур на поверхности различных диэлектрических и полупроводниковых стеклянных подложек. На практике периодические микроструктурированные сетки могут быть использованы для проведения счетного статистического анализа, а также для исследования в биологии и медицине при секвенировании, разделении, обнаружении, идентификации, количественном и структурном

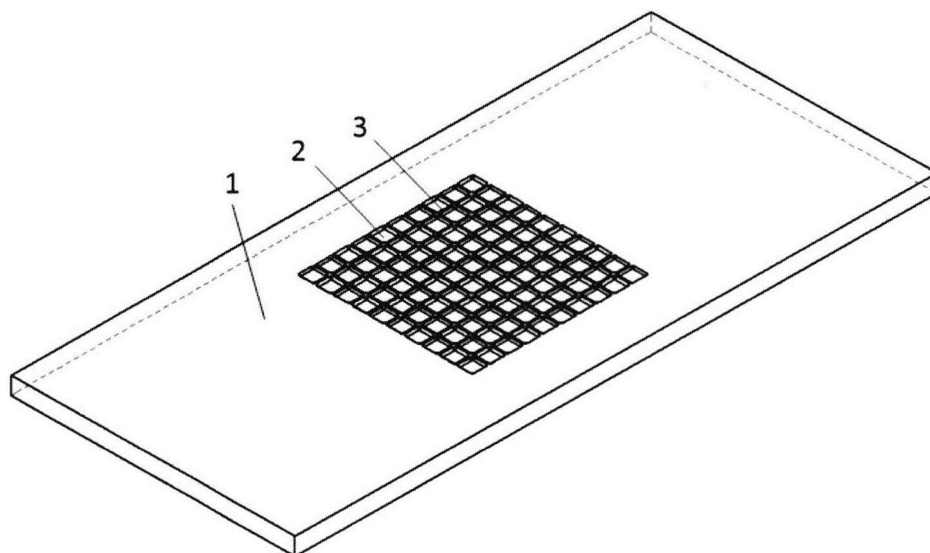
анализе биологических молекул и микрообъектов таких, как клеточные популяции (кровь, клеточные культуры), микроорганизмы, вирусы и т.д. [1].

Решаемая техническая задача заключается в усовершенствовании и упрощении конструкции устройства (выполнение изделия как одно целое), обеспечении изучения биологических микрообъектов на поверхности стеклянных подложек с заглубленными ячейками сетки, а также возможностью анализа микрообъектов высокоразрешающей электронной микроскопией.

Поставленная задача, в предлагаемом техническом решении оптически-прозрачной подложке с сеткой для анализа биологических микрообъектов, достигается тем, что сетка

сформирована на поверхности стеклянной подложки и состоит из периодических микроструктурированных областей,

имплантированных ионами газа и выполненных в виде ячеек с глубиной 60 нм. 8 ил.



Фиг. 1

(56) (продолжение):

Surfaces // Mater. Res. Soc. Symp. Proc., 2011, V.1354, pp.15-20.

RU 181921 U1

RU 181921 U1

Полезная модель относится к области биофизики, клеточной и молекулярной биологии, а именно к устройствам и приспособлениям для выполнения статистического анализа и исследования микрообъектов, а именно, к счетным устройствам (сеткам), состоящим из периодических микроструктур на поверхности различных диэлектрических и полупроводниковых стеклянных подложек. На практике периодические микроструктурированные сетки могут быть использованы для проведения счетного статистического анализа, а также для исследования в биологии и медицине при секвенировании, разделении, обнаружении, идентификации, количественном и структурном анализе биологических молекул и микрообъектов таких, как клеточные популяции (кровь, клеточные культуры), микроорганизмы, вирусы и т.д. [1].

Известно устройство, называемое счетной камерой с сетками Горяева, служащее для подсчета биологических объектов (Патент РФ №2126230, опубликованный 20.02.1999). Сетка Горяева состоит из больших и малых квадратов. Площадь одного большого квадрата $1/25$ мм, площадь одного малого квадрата $1/400$ мм² (размер малого квадрата 50×50 мкм). Существенные признаки счетной камеры с сетками Горяева, следующие: предметное (оптически прозрачное стекло) стекло, в котором имеются углубления с сетками, выгравированными на их дне.

Недостатком первого аналога, является то, что минимальный размер сетки 50×0.50 мкм, что усложняет или исключает возможность проведения подсчета более мелких биологических объектов, размерами в несколько микрон. Более того, так как сетка выполнена методом гравировки, ячейки сетки возвышаются над их границами - канавками гравировки. В этом случае ячейки сетки не могут играть роль стоков для микрообъектов - ячеек ловушек, что затрудняет фиксирование микрообъектов в отдельных ловушках.

Известна счетная спиралеобразная камера, предназначенная для счета организмов, которая представляет собой прозрачную стеклянную или пластмассовую чашку Петри с нанесенными по внутренней поверхности дна спиралеобразных канавок (бороздок) с определенными расстояниями между ними. Канавки изготавливаются способом гравировки или травления в соответствии избранному рисунку спирали. Расстояние между витками спирали выбирается в зависимости от количества и размеров подсчитываемых организмов. Оптимальные размеры составляют 1-2 мм. Ширина и глубина канавок 0.1 мм. (Патент РФ №70994, опубликованный 20.02.2008).

Недостатком второго аналога является то, что счетная спиралеобразная камера служит для подсчета только очень больших биологических объектов миллиметровых размеров, что исключает возможность подсчета мелких объектов микронных размеров. Кроме того, наличие в счетной камере спирали исключает возможность ее использования для отработанных методик подсчета биообъектов, разработанных для квадратных сеток.

Известно устройство - предметное стекло для микроскопического исследования гистологического объекта (Патент РФ №127935, опубликованный 10.05.2013.). Предметное стекло выполнено в виде стеклянной плоскопрямоугольной пластины, и снабжено полиэстеровой пленкой прямоугольной формы, разграфленной на квадратные ячейки 0.3×0.3 см. Полиэстеровая пленка (Avery-zvekborn 3553) обычно применяется для лазерных принтеров и копировальных аппаратов формата А4. Авторы предлагают использовать фрагмент вышеуказанной пленки и с помощью средств вычислительной и копировальной техники наносить разметку, образующую сетку с размером ячейки 0.3×0.3 см. Фрагмент пленки с нанесенной разметкой жестко закрепляют на стеклянной плоскопрямоугольной пластине.

Это устройство является наиболее близким к заявляемому техническому решению, и поэтому выбрано в качестве прототипа.

Недостатки прототипа:

5 - предлагаемые сетки выполнены только больших миллиметровых размеров, видимые с помощью оптического микроскопа, что (исключает) ограничивает возможность точной локализации, а также проведения подсчета и анализа мелких биологических объектов микронных размеров;

10 - описанное в прототипе предметное стекло является сложной конструкцией, поскольку состоит из двух отдельных частей (стеклянной плоскопрямоугольной пластины и полиэфировой пленки с сеткой).

Решаемая техническая задача заключается в усовершенствовании и упрощении конструкции устройства (выполнение изделия как одно целое) и обеспечении возможности изготовления периодически-микроструктурированных сеток различных размеров с заглубленными ячейками для подсчета биологических микрообъектов на 15 поверхности стеклянных подложек, с возможностью анализа микрообъектов высокоразрешающей электронной микроскопией.

Поставленная задача в предлагаемом техническом решении оптически-прозрачной подложке с сеткой для анализа биологических микрообъектов, достигается тем, что 20 сетка сформирована на поверхности стеклянной подложки и состоит из периодических микроструктурированных областей, имплантированных ионами газа и выполненных в виде ячеек с глубиной 60 нм.

На фиг. 1. Показан чертеж в изометрии оптически прозрачной подложки с сеткой для анализа биологических микрообъектов, содержащий: 1 - оптически-прозрачную 25 стеклянную подложку; 2 - заглубленные ионно-имплантированные области (ячейки сетки сформированные ионной имплантацией); 3 - не облученные стеклянные перегородки между ячейками сетки.

На фиг. 2. Показано СЭМ-изображение фрагмента периодически-микроструктурированной сетки, сформированной на поверхности кварцевого стекла имплантацией ионами аргона.

30 На фиг. 3. Показано изображение, полученное на оптическом микроскопе, фрагмента периодически-микроструктурированной сетки, сформированной на поверхности кварцевого стекла имплантацией ионами аргона.

На фиг. 4. Показано изображение, полученное на оптическом профилометре, фрагмента периодически-микроструктурированной сетки, сформированной на 35 поверхности кварцевого стекла имплантацией ионами аргона.

На фиг. 5. Показан профиль глубины ячеек в сетке, полученный на оптическом профилометре, от фрагмента периодически-микроструктурированной сетки, сформированной на поверхности кварцевого стекла имплантацией ионами аргона.

40 На фиг. 6. Показано СЭМ-изображение периодически-микроструктурированной сетки, сформированной имплантацией ионами аргона на поверхности кварцевого стекла с находящимся в ячейке сетки эритроцитом человека (показано стрелкой).

На фиг. 7. показано СЭМ-изображение периодически-микроструктурированной сетки, сформированной имплантацией ионами аргона на поверхности кварцевого стекла с находящимися в ячейках сетки бактериальными клетками (*Bacillus pumilus*).

45 На фиг. 8. показано изображение, полученное на оптическом микроскопе, фрагмента периодически-микроструктурированной сетки, сформированной на поверхности полупроводникового халькогенидного стекла GeSe_5 имплантацией ионами азота.

Рассмотрим способ изготовления оптически-прозрачной подложки с сеткой для

анализа биологических микрообъектов на конкретных примерах. Условие изготовления периодически-микроструктурированной сетки для подсчета биологических микрообъектов, заключается в формировании заданных микроструктур на поверхности исходной подложки. Формирование заданных периодических микроструктур осуществляется с помощью имплантации ионами газа с энергией 5-100 кэВ, дозой облучения $1 \cdot 10^{15} - 1.0 \cdot 10^{20}$ ион/см² через поверхностную маску в стеклянную подложку.

На фиг.1 показан в изометрии чертёж оптически прозрачной подложки 1 выполненной из стекла с периодически микроструктурированной сеткой на ее поверхности, элементами которой являются области подвергнутые, ионному облучению ионами газа с энергией 5-100 кэВ, дозой облучения $1 \cdot 10^{15} - 1.0 \cdot 10^{20}$ ион/см², выполненных в виде заглубленных ячеек (ячейки сетки с глубиной 60 нм) 2 разделенные необлученными стеклянными перегородками 3 между ячейками 2.

Пример 1. Оптически-прозрачная подложка с сеткой для анализа биологических микрообъектов изготовлена на поверхности стеклянной подложки, способ изготовления включает формирование заданных микроструктур на поверхности исходной подложки, при этом формирование заданных периодических микроструктур осуществляется с помощью имплантации на ускорителе ИЛУ-3 ионами инертного газа - Ar^+ через поверхностную маску - металлическую сетку с размерами ячейки ~ 40 мкм, с энергией $E=40$ кэВ, дозой облучения $D=1.0 \cdot 10^{18}$ ион/см, в диэлектрическую подложку из кварцевого стекла.

На фиг. 2 приведено наблюдаемое на сканирующем электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss), изображение периодически-микроструктурированной сетки, полученной непрерывной имплантацией ионами аргона кварцевого стекла через поверхностную маску. На изображении отчетливо видны периодически-чередующиеся темно-серые участки имплантированного кварцевого стекла, заключенные в светло-серую гладкую сетку (стенки ячеек) из не облученного стекла.

На фиг. 3 приведено изображение периодически-микроструктурированной сетки, сформированной непрерывной имплантацией ионами аргона в кварцевое стекло через поверхностную маску, наблюдаемую на оптическом микроскопе ПОЛАР-1 (Микромед). Как видно из приведенного изображения, периодическая микроструктура состоит из чередующихся темно-коричневых квадратных ячеек, относящихся к имплантированным участкам поверхности стеклянной подложки, разделенных стенками (светлые желтые области) не облученного кварцевого стекла. Размер имплантированных ячеек соответствует размеру ячеек используемой поверхностной маски.

На фиг. 4 приведено изображение периодически-микроструктурированной сетки, сформированной непрерывной имплантацией ионами аргона в кварцевое стекло через поверхностную маску, наблюдаемую на оптическом профилометре GontourGT (Bruker Nano Surface). Как видно из приведенного изображения, периодическая микроструктура состоит из чередующихся синих квадратных ячеек, относящихся к имплантированным участкам поверхности подложки, разделенных стенками (красные области) необлученного кварцевого стекла. Использование профилометра позволяет определить профиль поперечного сечения и измерить глубину ячейки, составляющую 60 нм (фиг. 5).

На фиг. 6 и 7 приведены СЭМ-изображения периодически микроструктурированных сеток, сформированных имплантацией ионами аргона на поверхности кварцевого стекла, содержащих биологические объекты (размерами в несколько микрон и менее) эритроцита человека и бактериальных клеток (*Bacillus pumilus*), соответственно.

Таким образом, периодически-микроструктурированные сетки, сформированные ионной имплантацией аргона на поверхности кварцевого стекла, предоставляют возможности для анализа, счета и исследований микронных биологических объектов.

Пример 2. В качестве подложки используют полупроводниковое халькогенидное стекло GeSe_5 . Имплантацию осуществляют на ускорителе ИЛУ-3 однозарядными ионами газа N^+ с энергией $E=40$ кэВ, дозой облучения $D=7.0 \cdot 10^{17}$ ион/см² в полупроводниковую подложку из халькогенидного стекла GeSe_5 через поверхностную металлическую сетку с размерами ячейки 25 мкм.

На фиг. 8 приведено наблюдаемое на оптическом микроскопе ПОЛАР-1 (Микромед), изображение периодически-микроструктурированной сетки, сформированной непрерывной имплантацией ионами азота в полупроводниковую подложку из халькогенидного стекла GeSe_5 . Как видно из приведенного изображения, периодическая микроструктура состоит из чередующихся светлых квадратных ячеек, относящихся к имплантированным участкам поверхности образца, разделенных стенками (желтые области) не облученного халькогенидного стекла GeSe_5 . Размер имплантированных ячеек соответствует размеру ячеек используемой поверхностной маски.

При изготовлении оптически-прозрачной подложки с сеткой для анализа биологических микрообъектов на поверхности диэлектрических и полупроводниковых стеклянных подложек режимы ионной имплантации по параметрам имеют следующие ограничения, $E=5-100$ кэВ и $D=1 \cdot 10^{15}-1.0 \cdot 10^{20}$ ион/см², обуславливается тем, что за границами этих режимов не достигается необходимый технический результат, и качество изготовленных периодически-микроструктурированной сетки не будет соответствовать необходимым требованиям (уменьшается контраст между ячейками и стенками получаемой сетки, что не позволит проводить требуемый анализ биообъектов).

Техническим результатом является то, что предлагаемая оптически-прозрачная подложка с сеткой для анализа биологических микрообъектов может быть изготовлена различных размеров непосредственно на поверхности диэлектрических и полупроводниковых стеклянных подложек (как одно целое изделие) при помощи непрерывной имплантации ионами газа. Полученные периодически-микроструктурированные сетки с заглубленными ячейками могут быть созданы на больших площадях образца в несколько квадратных сантиметров и использованы на практике для проведения счетного и статистического анализа для большого массива биологических микронных объектов. В предлагаемом техническом решении ячейки сетки играют роль стоков для микрообъектов - ловушек, что облегчает возможность фиксирования и локализацию микрообъектов для их наблюдения. При этом для анализа микрообъектов появляется возможность использовать высокоразрешающую электронную микроскопию.

На практике для проведения ионной имплантации и формирования микроструктурированных сеток могут быть использованы поверхностные маски различных типов, например, металлические проволочные сетки, монослои стеклянных или полимерных коллоидных микронных сферических частиц, полимерные структуры, сформированные фото- или электронной литографией и др. с заданными размерными параметрами, что позволяет создавать картотеку сеток различных размеров.

Список цитируемой литературы

1. Альперин П. Камеры счетные. Большая медицинская энциклопедия. Т. 12. 2-е изд. М: 1959.

(57) Формула полезной модели

Оптически-прозрачная подложка с сеткой для анализа биологических микрообъектов, отличающаяся тем, что сетка сформирована на поверхности стеклянной подложки и состоит из периодических микроструктурированных областей, имплантированных ионами газа и выполненных в виде ячеек с глубиной 60 нм.

10

15

20

25

30

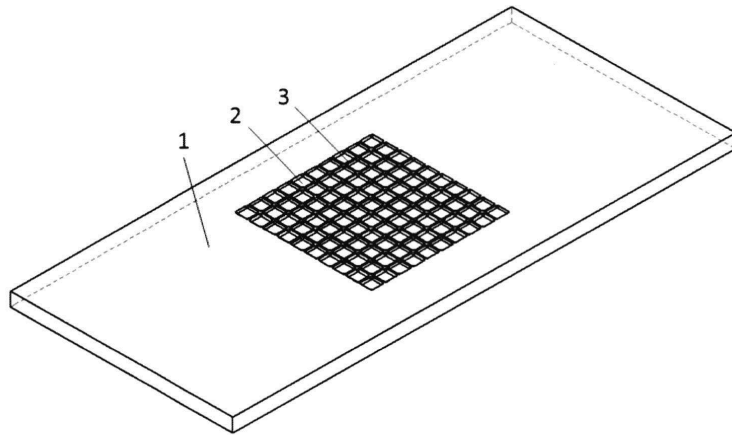
35

40

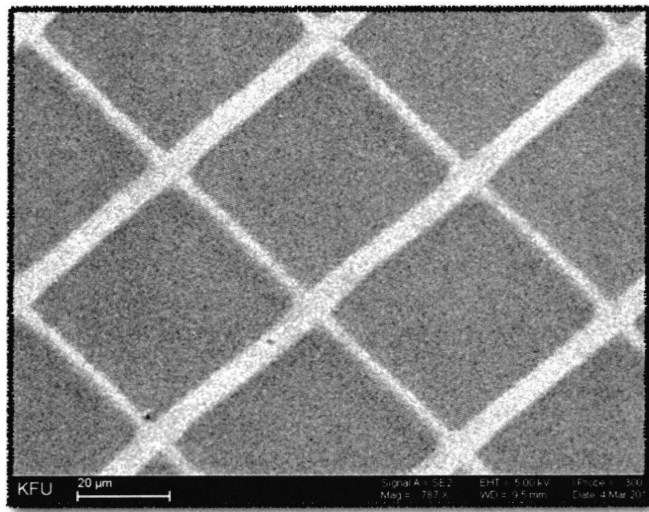
45

1

Оптически-прозрачная подложка с сеткой
для анализа биологических микрообъектов



Фиг. 1

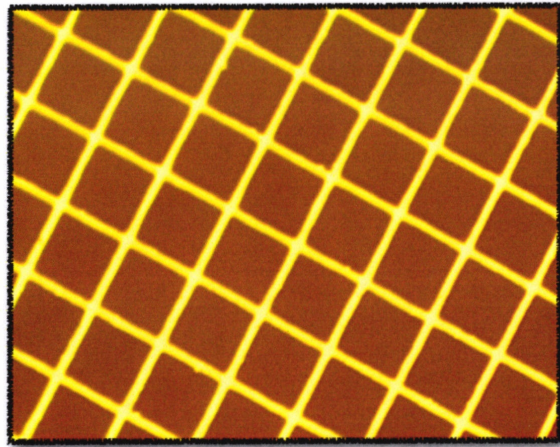


Фиг. 2

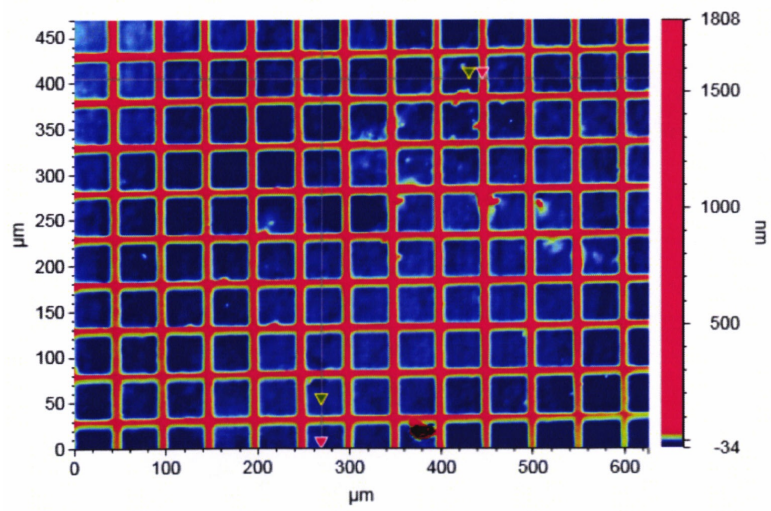
2

2

Оптически-прозрачная подложка с сеткой
для анализа биологических микробъектов

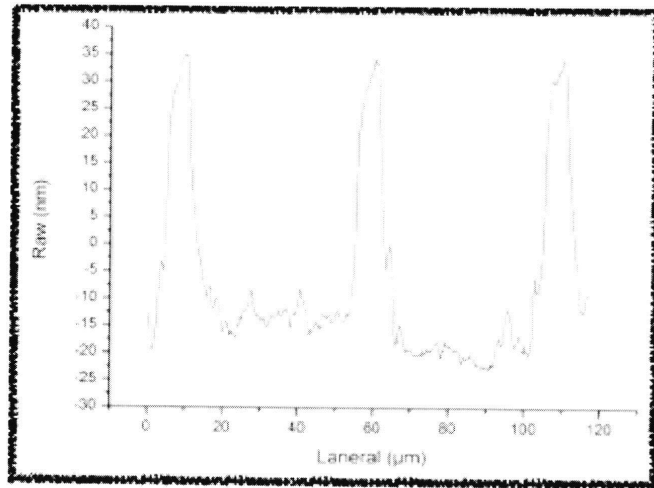


Фиг. 3

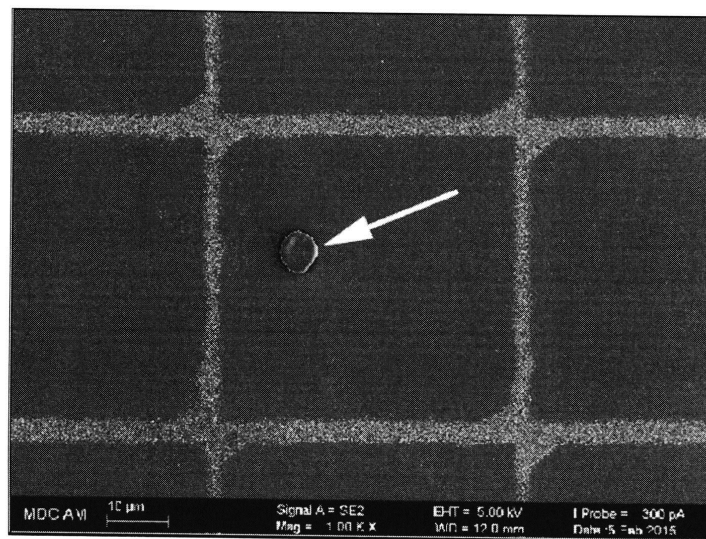


Фиг. 4

Оптически-прозрачная подложка с сеткой
для анализа биологических микробъектов



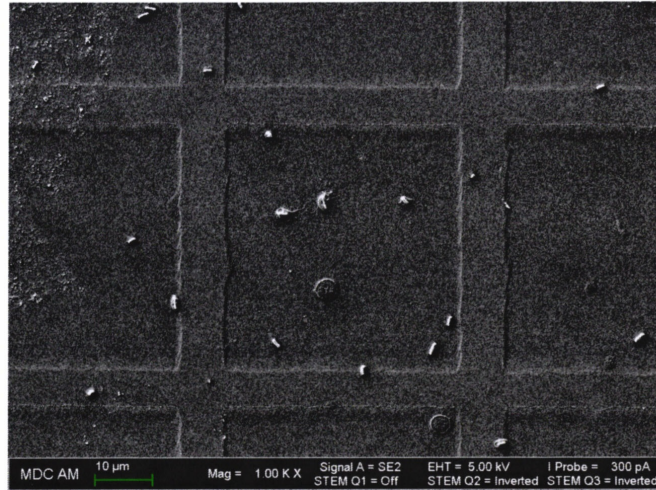
Фиг. 5



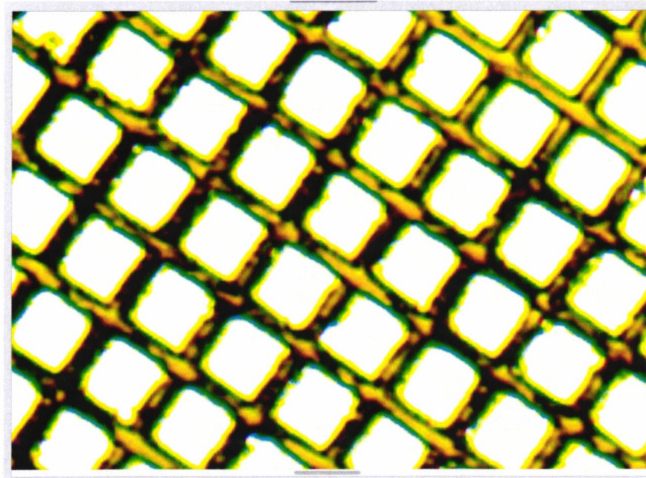
Фиг. 6

4

Оптически-прозрачная подложка с сеткой
для анализа биологических микрообъектов



Фиг. 7



Фиг. 8