



ИНТЕГРАЦИЯ МЕТОДОВ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ И МАТРИЧНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ОПТИЧЕСКИХ СУПЕРЛИНЗ

INTEGRATION OF SCANNING PROBE MICROSCOPY METHODS AND MATRIX OPTICAL SUPERLENSES TECHNOLOGY

И.В.Яминский^{1,2,3}, д.ф.-м.н., профессор МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, генеральный директор Центра перспективных технологий, директор Энергоэффективных технологий, вед. науч. сотрудник ИНЭОС РАН, (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И.Ахметова^{1,2,3}, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0001-6363-8202), З.Ван⁵, PhD, старший преподаватель (ORCID: 0000-0002-3282-1052) / yaminsky@nanoscopy.ru

I.V.Yaminskiy^{1,2,3}, Doctor of Sc. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Advanced Technologies Center, Director of Energy Efficient Technologies, Leading Sci. of INEOS RAS, A.I.Akhmetova^{1,2,3}, Engineer of A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies, Z.Wang⁵, PhD, Reader in imaging, Bangor University, UK

DOI: 10.22184/1993-8578.2020.13.5.258.262

Получено: 21.08.2020 г.

Наблюдение живой природы с нанометровым пространственным разрешением имеет первостепенное значение для понимания многих фундаментальных процессов, например функционирования сетей из живых нейронов, бактериальной антибиотикорезистентности, взаимодействия вирусов с молекулярными рецепторами. Для получения полноценной и достоверной информации требуется комбинация высокоинформативных методов, к которым относятся оптическая и сканирующая зондовая микроскопия. На их базе создается цифровая платформа бионаноскопии.

Wildlife observation with nanometer spatial resolution is of paramount importance for understanding many fundamental processes, for example, the functioning of living neurons networks, bacterial antibiotic resistance, and the viruses interaction with molecular receptors. To obtain complete and reliable information, a combination of highly informative methods is required, which include optical and scanning probe microscopy. On this basis a digital bionanoscopy platform is being created.

В настоящее время при визуализации биологических систем прикладываются энергичные усилия для повышения быстродействия при обзоре большого поля с сохранением высокого пространственного разрешения на уровне

единиц нанометров. Такую возможность предоставляют оптические методы высокого разрешения с использованием флуоресцентных агентов и методы сканирующей зондовой микроскопии. В 2011 году Zengbo Wang разработал новую

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments.

² ООО НПП "Центр перспективных технологий" / Advanced Technologies Center.

³ ООО "Энергоэффективные технологии" / Energy Efficient Technologies.

⁴ ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Russia.

⁵ Университет Бангор, Бангор, Великобритания / Bangor University, Bangor, United Kingdom.

технологии микролинзовой оптики с разрешением на уровне 60 нм [1, 2, 3]. Научной группой Z.Wang был разработан принцип оптической микроскопии с помощью твердой иммерсионной микролинзы на основе метаматериала – mSIL (metamaterial Solid Immersion Lens) [4]. Микролинза mSIL изготавливается путем плотной укладки наночастиц с высоким показателем преломления (например, анатаза TiO_2) в полусферическую твердую иммерсионную микролинзу диаметром 10–30 мкм. Такая микролинза осуществляет преобразование эванесцентной волны из ближней зоны вблизи своей границы в распространяющуюся волну в дальнем поле. Микролинза успешно работает в белом свете. По сравнению с другими микролинзами mSIL работают эффективнее, создавая более качественные оптические изображения структур нанометрового диапазона, включая поверхности микросхем и объектов биологического происхождения – клеток и аденовирусов.

Одиночные линзы на основе микросфер активно используются в фундаментальных исследованиях как для увеличения разрешения оптических микроскопов с преодолением дифракционного предела, так и совместного использования с атомно-силовым микроскопом за счет закрепления микросферы из кварца или титаната бария на кантилере. Однако в предложенных решениях имеются существенные недостатки: малое поле обзора, низкое быстродействие и, как следствие, проведение сильно усеченного по времени и пространству

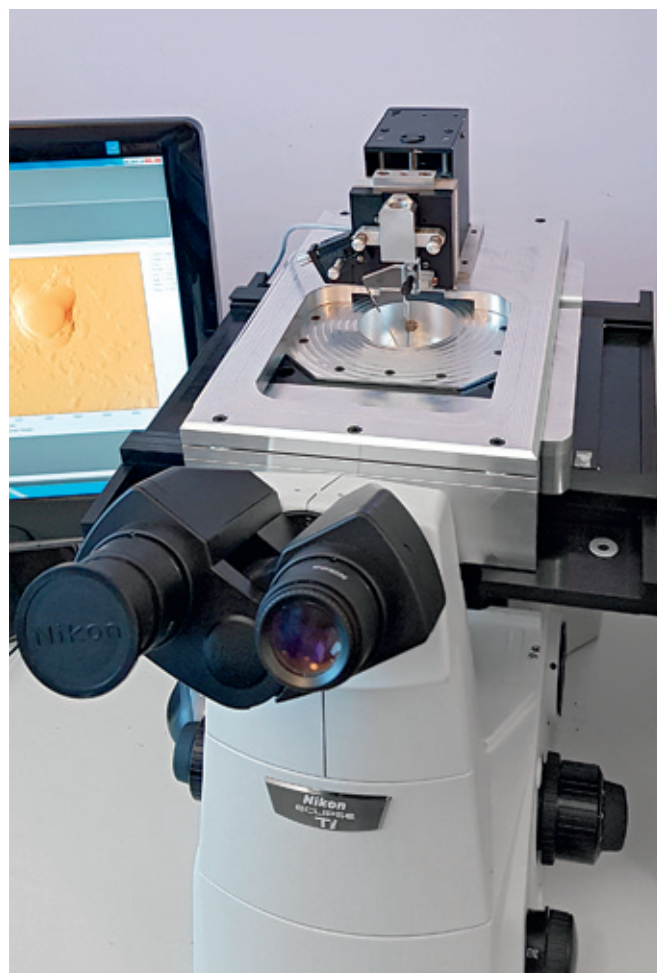


Рис.1. Установка для капиллярной микроскопии на базе оптического инвертированного микроскопа Nikon Ti-U

Fig.1. Capillary microscopy unit based on Nikon Ti-U optical inverted microscope

Currently, in the imaging of biological systems, vigorous efforts are being made to increase the speed of a large field survey while maintaining high spatial resolution at the level of a few nanometers. This opportunity is provided by high-resolution optical methods using fluorescent agents and scanning probe microscopy methods. In 2011 Zengbo Wang developed a new microlens optics technology assuring resolution of 60 nm [1, 2, 3]. Z.Wang scientific group developed the optical microscopy principle

using a solid immersion microlens based on a metamaterial – mSIL (metamaterial Solid Immersion Lens) [4]. The mSIL microlens is manufactured by dense packing of nanoparticles with a high refractive index (for example, anatase TiO_2) in a hemispherical solid immersion microlens of 10–30 μm diameter. Such a microlens transforms the evanescent wave from the close to zone near its boundary into a propagating wave in the far field. The microlens works well in white light. As compared with other microlenses,

mSIL works more efficiently by creating better optical images of structures in the nanometer range, including the microcircuits surfaces and biological objects.

Single lenses based on microspheres are actively used in fundamental research both to increase the resolution of optical microscopes by overcoming the diffraction limit, and to use them together with an atomic force microscope by attaching a quartz or barium titanate microsphere to a cantilever. However, the



наблюдения процессов в живой природе. В оптической микроскопии для преодоления дифракционного предела широко используются методы, отмеченные Нобелевской премией по химии 2014 года (E. Betzig, S.W. Hell, W.E. Moener). Эти методы позволяют получить дискретное оптическое изображение с нанометровой детализацией. К ограничениям этого метода относится необходимость использования флуоресцентных меток и веществ, что налагает особые условия на пробоподготовку и на сами наблюдаемые объекты.

Совмещение микролинзовой технологии и совокупности методов зондовой микроскопии, включая атомно-силовую микроскопию, сканирующую капиллярную микроскопию, электрохимическую микроскопию, высокоскоростную зондовую микроскопию, разрабатываемые в нашей научной группе, позволяет создать цифровую платформу бионаноскопии с рекордными параметрами по скорости наблюдения и пространственному разрешению. Кроме того, этот подход дает возможность изучать объекты на полях вплоть до миллиметровых размеров. Благодаря создаваемой цифровой платформе можно получить детальную и полноценную картину наблюдаемых явлений. С ее помощью становится возможным накопление новых экспериментальных данных и результатов при изучении таких важных задач биомедицины, как раннее обнаружение вирусных агентов и инфекций, бактериальная

антибиотикорезистентность, топология и функционирование сетей живых нейронов.

Высокоскоростная сканирующая зондовая микроскопия в последнее время активно развивается для наблюдения процессов в биологических системах. Так, в 2019 году в журнале Nature была опубликована статья, где авторы следили за изменением механической жесткости турсора клетки при ее делении [5]. Однако зарегистрировать процесс перекрытия самого перешейка делящихся клеток не удалось из-за ограничения в скорости измерений. Другим ограничением быстродействующей зондовой микроскопии является, как правило, небольшое поле сканирования. Этот недостаток призвана решить матричная микролинзовая оптика. Эта оптика, например, может реализовать быстрый поиск бактерии, совершающей осцилляции нанометрового масштаба, а зондовая микроскопия проведет последующее детальное изучение характера этих колебаний. Таким образом, можно существенно сократить общее время определения воздействия антибиотика на бактериальную клетку. Важно, что зондовая микроскопия дает важную дополнительную информацию о клетках, получить которую другими способами не удастся. В работе [6] с помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что липопротеин Lpp регулирует механические свойства клеточной оболочки кишечной палочки и ее устойчивость к антибиотикам. Золотым стандартом определения устойчивости бактерий к антибиотикам является их

proposed solutions have significant drawbacks: a small field of view, low speed and, as a consequence, observation of processes in the living nature which is greatly reduced in time and space. In order to overcome the diffraction limit, the optical microscopy widely uses the methods awarded by the 2014 Nobel Prize in Chemistry (E. Betzig, S.W. Hell, W.E. Moener). These methods provide a discrete optical image with a nanometer detail. Limitations of this method include a need to use fluorescent labels and substances, which

necessitates special conditions to sample preparation and to the observed objects themselves.

Combination of microlens technology and a set of probe microscopy methods, including atomic force microscopy, scanning capillary microscopy, electrochemical microscopy and high-speed probe microscopy developed in our research group, allows us of creating a digital bionanoscopy platform with record parameters in terms of observation speed and spatial resolution. In addition, this approach makes it possible to study objects in fields down

to millimeter sizes. Thanks to the digital platform being created, one can get a detailed and complete picture of the observed phenomena. With its help it becomes possible to accumulate new experimental data and results when studying such important problems of biomedicine as the early detection of viral agents and infections, bacterial antibiotic resistance, topology and functioning of the living neuron networks.

Recently the high-speed scanning probe microscopy has been dynamically developed to observe processes in biological



выращивание на культуральной среде с добавками антибиотиков. Однако этот процесс часто бывает очень длительным, что становится недопустимым при выявлении характера бактериальной инфекции и при принятии решения о медикаментозном лечении.

Существенный прогресс в визуализации живых нейронов продемонстрировали атомно-силовая [7] и сканирующая капиллярная (ион-проводящая) микроскопия [8]. В результате удается с нанометровым пространственным разрешением наблюдать топологию сетей нейронов в буферных растворах. Существующие работы в области изучения нейронов в основном связаны с наблюдением топографии нейронных сетей. Однако остаются наиважнейшие и вместе с тем экспериментально плохо изученные вопросы: связь между топографией нейронных сетей и траекторией прохождения сигналов, установление взаимосвязи между нейронами в процессе их роста, молекулярные механизмы памяти и запись информации через топографию нейронных сетей и многие другие нерешенные задачи. Цифровая платформа бионаноскопии призвана их решить.

Предлагаемое аппаратное решение состоит из двух основных частей:

1. массива оптических микролинз, расположенного на инвертированном оптическом микроскопе с 40-100-кратным увеличением,
2. многофункционального сканирующего зондового микроскопа с режимами

атомно-силового, капиллярного и электрохимического измерений, установленного на инвертированном микроскопе с доступом для сканирования кантилевером поверхности массива микролинз и/или сенсорной поверхности.

Зондовая микроскопия позволяет проводить визуализацию объектов на воздухе и в жидких средах и одновременно выполнять следующие функции:

- осуществлять доставку веществ и реагентов в область нанометровых размеров,
- проводить электрофизиологические исследования,
- измерять картину прохождения электрических сигналов,
- реализовывать наномеханические воздействия,
- обрабатывать данные и изображения с использованием алгоритмов искусственного интеллекта.

С помощью аппаратуры, созданной на основе оптической и сканирующей зондовой микроскопии, возможно изучение широкого класса объектов, включая биополимерные пленки и мембраны, вирусы и бактерии, живые клетки высших организмов.

В результате цифровая платформа бионаноскопии позволяет проводить наблюдения сложных биологических систем с рекордными параметрами по быстродействию и пространственному разрешению.

systems. Hence, in 2019 an article in the Nature was published that described how the authors monitored a change in the mechanical rigidity of the cell turgor during its division [5]. However, it was not possible to record the process of overlapping the dividing cell isthmus because of the measurement speed limitation. Another limitation of the high-speed probe microscopy is the generally small scan field. This drawback is intended to be solved by the matrix microlens optics. Such optics, for example, can perform a quick search of a bacterium

making nanoscale oscillations while the probe microscopy can carry out a subsequent detailed study of the nature of these oscillations. Thus, it is possible to significantly reduce the total time to determine the effect of the antibiotic on a bacterial cell. It is important that probe microscopy provides important additional information about cells that cannot be obtained by other methods. In work [6] it was shown with the aid of the atomic force microscopy, that Lpp lipoprotein regulates mechanical properties of the *E. coli* cell wall and its resistance to antibiotics.

The gold standard for determining resistance of bacteria to antibiotics is to grow them on a culture medium supplemented with antibiotics. However, this process is often very long, which becomes unacceptable when identifying the nature of the bacterial infection and when deciding on drug treatment.

Atomic force [7] and scanning capillary (ion conductance) microscopy [8] have demonstrated a significant progress in visualization of living neurons. As a result, it is possible to observe the topology of neuron networks in buffer solutions



Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-12-00389) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-32-90036).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wang Z., Guo W., Li L., Luk'yanchuk B., Khan A., Liu Z., Chen Z., Hong M. Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope, *Nature Communications* (2011) 2, p. Article No. 218. <https://doi.org/10.1038/ncomms1211>.
2. Monks J., Yan B., Hawkins N., Vollrath F., Wang Z. Spider Silk: Mother Nature's Bio-Superlens, *Nano Letters*. 16, (2016) 5842–5845. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b02641>.
3. Yan B., Yue L., Monks J.N., Yang X., Xiong D., Jiang C., Wang Z. Superlensing Plano-Convex-Microsphere (PCM) lens for direct laser nano marking and beyond, *Opt. Lett.*, 45 (2020) 1168-1171.
4. Fan W., Yan B., Wang Z.B., Wu L. Three-dimensional all-dielectric metamaterial solid immersion lens for subwavelength imaging at visible frequencies, *Sci. Adv.* 2, (2016) e1600901. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1600901>.
5. Odermatt P.D., Hannebelle M.T.M., Eskandarian H.A. et al. Overlapping and essential roles for molecular and mechanical mechanisms in mycobacterial cell division. *Nat. Phys.* 16, (2020) 57–62. <https://doi.org/10.1038/s41567-019-0679-1>.
6. Mathelié-Guinlet M., Asmar A.T., Collet J. et al. Lipoprotein Lpp regulates the mechanical properties of the E. coli cell envelope. *Nat Commun* 11, (2020) 1789. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15489-1>.
7. Shibata M., Uchihashi T., Ando T. et al. Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells. *Sci Rep* 5, (2015) 8724. <https://doi.org/10.1038/srep08724>.
8. Simeonov S., Schäffer T.E. High-speed scanning ion conductance microscopy for sub-second topography imaging of live cells, *Nanoscale* 11, (2019) 8579. <https://doi.org/10.1039/c8nr10162k>.

with nanometer spatial resolution. The existing papers devoted to study of neurons deal, mainly, with observation of the neural networks topography. However, the most important and, at the same time, poorly studied experimentally issues remain: a relationship between the neural networks topography and the trajectory of signals; establishment of the relationship between neurons in the process of their growth; molecular mechanisms of memory and information recording through the neural networks topography; and many other unsolved problems. The digital bionanoscopia platform should solve them.

The proposed hardware solution consists of two main parts:

1. an array of optical microlenses located on an inverted optical

microscope with 40x-100x magnification,

2. a multifunctional scanning probe microscope working in the modes of atomic force, capillary and electrochemical measurements that is installed on an inverted microscope and is capable of scanning the surface of a microlens array and / or a sensor surface with the aid of a cantilever.

The probe microscopy allows objects visualization in air and in liquid and simultaneously performs the following functions:

- to deliver substances and reagents to the nanometer-sized area,
- to conduct electrophysiological studies,
- to measure the pattern of electrical signals,

- to implement nanomechanical effects,
- to process data and images using artificial intelligence algorithms.

With the help of the equipment developed on the basis of optical and scanning probe microscopy it is possible to study a wide class of objects, including biopolymer films and membranes, viruses/bacteria, and living cells of higher organisms.

As a result, the digital bionanoscopia platform makes it possible to observe complex biological systems with record parameters in terms of speed and spatial resolution. ■

This work was supported by the Russian Science Foundation, project No. 20-12-00389, and the Russian Foundation for Basic Research, project No. 20-32-90036.

**НОВЫЕ
ДАТЫ**

2-3.11.20

SEMIEXPO RUSSIA

SEMIEXPO Russia объединяет международную специализированную выставку с двухдневной деловой программой, где ежегодно принимают участие руководители, эксперты, топ-менеджеры крупнейших компаний по микроэлектронике, представители органов государственной власти, научно-исследовательских институтов и международных ассоциаций.

Программные мероприятия на SEMIEXPO Russia 2020

SEMI Member Forum 2020

Международный MEMS Forum

Новый этап конкурса
«Инновационная радиоэлектроника»

Обзор карьерных возможностей
и ежегодный День Талантов

Экспортные перспективы.
Открытый диалог с зарубежными
рынками

Экспозиция кластеров из Европы и
Азии

МОСКВА

ЭКСПОЦЕНТР

2 – 3 НОЯБРЯ 2020

**ВЫСТАВКА И КОНФЕРЕНЦИЯ
ПО ТЕХНОЛОГИЯМ, МАТЕРИАЛАМ,
СТАНДАРТАМ И ОБОРУДОВАНИЮ
В ОБЛАСТИ МИКРОЭЛЕКТРОНИКИ**

Больше информации на официальном сайте

www.semiexpo.ru

 **@semiexporussia**