

**ФГУП «Научно-производственная корпорация  
«Государственный оптический институт им. С. И. Вавилова»**

---

*На правах рукописи*

**ПАРФЕНОВ Петр Сергеевич**

**РАЗРАБОТКА ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ  
ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЪЕКТОВ С ДИФРАКЦИОННЫМ И  
СУБДИФРАКЦИОННЫМ ПРОСТРАНСТВЕННЫМ  
РАЗРЕШЕНИЕМ**

01.04.05 – Оптика

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата технических наук**

**Санкт-Петербург**

**2008**

Работа выполнена в ФГУП "Научно-производственная корпорация  
"Государственный оптический институт им. С. И. Вавилова"

**Научные руководители:** доктор физико-математических наук  
Баранов Александр Васильевич  
доктор технических наук  
Шилов Валерий Борисович

**Официальные оппоненты:** доктор технических наук  
Горбунов Георгий Георгиевич  
доктор физико-математических наук  
Полищук Владимир Анатольевич

**Ведущая организация:** Институт аналитического приборостроения  
РАН

Защита диссертации состоится «03» декабря 2008 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 407.001.01 ФГУП "НПК "Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова", расположенного по адресу: 199034, г. Санкт-Петербург, Биржевая линия, д. 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор физ.-мат. наук,  
профессор

Данилов В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы**

Одной из важнейших задач современной оптики является разработка новых научно-технических подходов к созданию спектральных оптических приборов и методов исследования объектов с дифракционным и субдифракционным пространственным разрешением. Диссертационная работа посвящена развитию перспективных направлений современной оптической микроскопии: характеристике параметров различных материалов с субдифракционным пространственным разрешением с помощью ближнепольной микроскопии и экспресс-диагностики объектов с использованием «биочиповых» структур. В первом случае используется анализ спектров люминесценции и/или комбинационного (рамановского) рассеяния света [1], а во втором – параллельный анализ люминесцентных свойств массива характеризуемых объектов [2, 3]. Эти методы являются одними из наиболее перспективных при физических, химических и биологических исследованиях, а также в медицинских приложениях, что обусловлено их высокой чувствительностью и информативностью. Оптическая диагностика со сверхвысоким пространственным разрешением крайне важна для nanoиндустрии, поскольку позволяет контролировать такие параметры наноструктур как размер, форма и взаимное расположение, а также химический состав и наличие локальных механических напряжений. Аналогичным пространственным разрешением должны обладать и методы контроля элементной структуры современных интегральных схем и интегральных схем ближайшего будущего.

Пространственное разрешение обычных люминесцентных и рамановских микроскопов ограничено дифракционным пределом. В связи с этим они не позволяют проводить измерения с разрешением лучше 250 нм и дают лишь пространственно усредненную спектральную информацию. Поэтому исследования различных структур с более высоким пространственным разрешением обычно выполняются методами электронной микроскопии, зачастую требующей при-

менения разрушающих методов пробоподготовки или приводящей в процессе измерения к повреждению или разрушению образцов. Пространственный рельеф планарных структур может быть исследован с использованием туннельных и атомно-силовых микроскопов, которые позволяют получить субнанометровое разрешение (вплоть до отдельных молекул), однако с их помощью не удастся провести химическую идентификацию структурных элементов. Кроме того, как анализируемые биомолекулы, так и наноструктуры часто внедрены в различные матрицы (мембраны, диэлектрические и полупроводниковые слои и т.п.), и характеризовать их геометрические параметры с помощью атомно-силовой микроскопии становится невозможно.

Одновременно решить проблемы повышения пространственного разрешения вплоть до 20-50 нм и химической идентификации структурных элементов в оптическом диапазоне длин волн возможно путем объединения методов ближнепольной микроскопии, люминесцентного и рамановского анализа [4]. Ближнепольный рамановский и люминесцентный микроскопы позволяют визуализировать отдельные белковые молекулы в клеточной мембране, определить форму, химический состав и внутренние напряжения в наноструктурах, включая полупроводниковые наноструктуры. Поэтому разработка методов и аппаратуры для проведения люминесцентных и рамановских исследований на наномасштабном уровне является одной из актуальных задач современной наноиндустрии.

Ближнепольная оптическая микроскопия с использованием волоконно-оптических зондов имеет существенные недостатки. Для достижения нанометрового пространственного разрешения необходимо использовать зонды с малой апертурой, что приводит к резкому падению интенсивности возбуждающего света, передаваемого по волоконному волноводу. Кроме того, с увеличением пространственного разрешения интенсивности оптических сигналов уменьшаются, т.к. они собираются со всё меньших объемов исследуемого образца. Данные потери не могут быть компенсированы простым увеличением интенсивности возбуждающего излучения, поскольку при этом происходит ра-

зогрев и разрушение зонда. Эти проблемы особенно важны для регистрации рамановских спектров наноструктур, так как интенсивность рассеянного света много меньше интенсивности люминесценции. Одним из способов их решения является использование металлических заостренных зондов (с радиусом кривизны острия 10-50 нм). Наличие металлического зонда приводит к резкому усилению оптического поля вблизи его острия при освещении зонда оптическим излучением, резонансно возбуждающим локальные плазмоны острия [5]. Характерный размер области локализации усиленного поля примерно равен радиусу кривизны острия, что определяет пространственное разрешение метода. Важной задачей, связанной с повышением чувствительности измерений с помощью ближнепольных рамановских и люминесцентных спектрометров, является также выбор оптимальных схем освещения и детектирования. При создании таких приборов необходимо также решить задачи стабилизации расстояния «зонд-образец», изготовления и оптимизации механических, геометрических и оптических параметров зондов, а также разработки аналитических методов обработки получаемой спектроскопической информации.

Микролюминесцентный анализ «биочиповых» структур с большим массивом одновременно анализируемых ячеек является перспективным методом оптического экспресс-контроля [2, 3]. Необходимость дальнейшего увеличения скорости определений, требующее увеличения числа одновременно анализируемых ячеек, поставило актуальную задачу разработки адекватной оптической техники анализа «биочиповых» структур нового поколения.

**Целью работы** является разработка методов люминесцентной и рамановской микроскопии исследования объектов с дифракционным и субдифракционным пространственным разрешением и их техническая реализация: безапертурная ближнепольная микроскопия и экспресс-диагностика «биочиповых» структур.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Проанализировать возможности технической реализации и разработать принципиальную схему безапертурного рамановского и люминесцентного спектрометра ближнего поля, использующего эффект локального усиления оптических полей вблизи острия металлических зондов.
2. Разработать методы изготовления металлических зондов и определения их резонансных оптических характеристик.
3. Исследовать особенности реализации и разработать аппаратные принципы построения системы регулирования расстояния «зонд-образец» для ближне-полюсных зондовых микроскопов.
4. Разработать метод сопряжения систем позиционирования спектрометра ближнего поля, позволяющий совместить плоскость образца, вершину зонда и центр сфокусированного лазерного луча.
5. Разработать методику регистрации оптического сигнала спектрометра ближнего поля при работе в одноканальном режиме счета фотонов, а также разработать алгоритм управления работы в указанном режиме.
6. Разработать метод микролюминесцентного анализа «биочиповых» структур с большим массивом одновременно анализируемых ячеек (15x20).

**Научная новизна работы** заключается в том, что в ней впервые:

- исследованы особенности конкуренции гравитационных и капиллярных сил в процессе электрохимического травления, используемого при изготовлении металлических зондов с радиусом кривизны острия менее 15 нм;
- предложен метод определения резонансных оптических характеристик серебряных и золотых зондов для ближнеполюсного микроскопа, основанный на регистрации спектра рассеяния зонда и определении спектрального положения максимума рассеяния;
- предложен оригинальный метод возбуждения и детектирования люминесценции, позволяющий получать изображения и проводить параллельный анализ большого массива ячеек биочипа.

**Практическая ценность работы** заключается в разработке:

- принципиальной схемы безапертурного рамановского и люминесцентного спектрометра ближнего поля для исследования и характеристики как прозрачных, так и непрозрачных образцов с пространственным разрешением до 50 нм;
- метода изготовления металлических зондов с радиусом острия до 15 нм травлением на постоянном токе в капле электролита и определения их резонансных оптических характеристик;
- системы регулирования расстояния «зонд-образец», позволяющей поддерживать расстояние в диапазоне 5-20 нм;
- системы сопряжения элементов взаимного позиционирования металлического острия и образца в поле лазерного излучения;
- алгоритма управления, программного обеспечения и методики регистрации оптического сигнала спектрометра ближнего поля при работе в одноканальном режиме счета фотонов;
- принципиальной схемы и изготовления опытного образца видеоанализатора изображений для микролюминесцентного анализа «биочиповых» структур с большим массивом одновременно анализируемых ячеек.

**На защиту выносятся**

1. Принципиальная схема безапертурного рамановского и люминесцентного спектрометра ближнего поля для исследования и характеристики как прозрачных, так и непрозрачных образцов с пространственным разрешением до 50 нм.
2. Метод изготовления металлических зондов для сканирующих ближнепольных микроскопов, позволяющий получать зонды с радиусом острия менее 15 нм.
3. Метод определения резонансных оптических характеристик серебряных и золотых зондов для ближнепольного микроскопа, основанный на регистрации спектра рассеяния зонда и определении спектрального положения максимума рассеяния.

4. Система регулирования расстояния «зонд-образец», позволяющая поддерживать расстояние в диапазоне 5-20 нм.
5. Система сопряжения элементов взаимного позиционирования металлического острия и образца в поле лазерного излучения.
6. Алгоритм управления спектрометром и программное обеспечение для регистрации оптических сигналов в одноканальном режиме счета фотонов.
7. Метод возбуждения и детектирования люминесценции биочипов, позволяющий получать изображения и проводить параллельный анализ большого массива ячеек, и принципиальная схема видеоанализатора изображений.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертации докладывались на 15 российских и международных научных конференциях: Optical micro- and nanotechnologies (Санкт-Петербург, 2002), FLAMN-07 (Санкт-Петербург, 2007), ICSI-5 (2007, Марсель, Франция), Нейробиотелеком-2004 (Санкт-Петербург, 2004), ежегодных НТК СПбГУТ (Санкт-Петербург, 2002-2006), НУМК СПбГУ ИТМО (Санкт-Петербург, 2003, 2005) и межвузовских КМУ (Санкт-Петербург, 2007, 2008).

**Публикации.** Основные результаты диссертации опубликованы в 14 печатных работах, список которых приведен в конце автореферата, в том числе 2 работы опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК. По результатам работы получен 1 патент.

**Результаты работы** использовались во ФГУП "ГОИ им. С.И. Вавилова" в НИР "Создание экспериментального макета ближнепольного микроскопа для использования в прецизионном машиностроении" за 2002–2003 гг. и "Сканирующий люминесцентный микроскоп ближнего поля" за 2004 г., выполнявшихся по государственным контрактам №40.600.14.0011 и №40.600.11.0019 в рамках ФЦНТП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники" на 2002–2006 гг., и в ОКР "Разработка и изготовле-



ние люминесцентных видеоанализаторов биочипов для диагностики генетических и инфекционных заболеваний" за 2003–2004 гг., выполнявшейся по государственному контракту №36.6656.11.0270 от 28.04.2003 в рамках ФЦП "Реформирование и развитие оборонно-промышленного комплекса (2002-2006 гг.)", направление 3.

В СПбГУ ИТМО результаты работы использовались при выполнении Проекта аналитической ведомственной целевой программы "Развитие научного потенциала высшей школы (2006-2008)" РНП.2.1.1.1075 "Физические основы создания новых сверхвысокочувствительных люминесцентных сенсоров для экологических и биомедицинских применений: эффекты переноса энергии фотовозбуждения в системах квантовая точка – молекула".

Соответствующие акты внедрения приложены к диссертации.

**Личный вклад автора.** Содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту, отражают персональный вклад автора в опубликованные работы. Все представленные в диссертации результаты получены лично автором. Подготовка к публикациям полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад диссертанта был определяющим.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы, включающего 113 наименований, и приложения. Основная часть работы изложена на 129 страницах машинописного текста. Работа содержит 70 рисунков и 2 таблицы.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность научных исследований, проводимых в диссертационной работе, сформулированы цели и задачи работы, а также представлены выносимые на защиту основные научные результаты.

**В первой главе** проведен обзор основных микроскопических методов исследования объектов с дифракционным и субдифракционным пространственным разрешением, таких как люминесцентная, атомно-силовая и ближнепольная микроскопия. Показано, что для решения задач структурно-химической характеристики объектов, а также определения механических напряжений в них с пространственным разрешением до 10 нм необходимо использование безапертурного сканирующего оптического микроскопа ближнего поля. Такой микроскоп, анализирующий как люминесцентный, так и рамановский отклики, позволит решить эту задачу, как в физике полупроводников, так и в биологии. Делается вывод, что разработка методик и аппаратуры для проведения люминесцентных и рамановских исследований на субдифракционном уровне является одной из актуальных задач современной оптической микроскопии.

**Во второй главе,** посвященной оптической микроскопии с субдифракционным оптическим разрешением, рассматриваются технические вопросы реализации ближнепольной оптической спектроскопии, объединяющей возможности атомно-силовой микроскопии и оптической спектроскопии субдифракционного пространственного разрешения.

Одним из вариантов реализации ближнепольной сканирующей микроскопии является туннельный сканирующий оптический микроскоп (ТСОМ). С точки зрения целей настоящей работы важно, что эта схема может быть применена для возбуждения люминесценции образца и ее спектрального анализа с пространственным разрешением нанометрового масштаба, определяемым радиусом закругления вершины световода. Для проведения люминесцентных измерений в рамках данной работы изготовлен макет ТСОМ, в конструкции которого использованы механические и электронные элементы растрового туннельного профилографа, где металлическое острие заменено острием стекловолоконного световода, а также исследованы особенности его работы. Этот макет ТСОМ использовался в дальнейшем для регистрации резонансных оптических характеристик металлических зондов (серебряных и золотых).

Известно, что значительное повышение чувствительности рамановских и люминесцентных измерений достигается при использовании т.н. гигантского комбинационного рассеяния света (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) и гигантской люминесценции. Ограниченное дифракционным пределом пространственное разрешение SERS преодолевается в случае использования техники безапертурной ближнепольной микроскопии, в которой эффект SERS реализован с помощью металлического заостренного зонда. Такая техника получила название усиленного острием рамановского рассеяния (Tip-Enhanced Raman Scattering, TERS). На основе техники TERS, эффекта гигантского усиления рассеяния и люминесценции реализована схема безапертурного ближнепольного микроскопа-спектрометра. В этой схеме усиление оптического поля возникает вблизи острия металлического зонда атомно-силового или ближнепольного сканирующего микроскопа.

В результате выполнения работы разработаны несколько вариантов принципиальной схемы построения рамановского спектрометра ближнего поля, предназначенных для проведения исследований образцов разного типа с использованием оптических и металлических зондов, и проведено их сопоставление. На основе проведенного сравнения сделан вывод, что оптимальным вариантом является реализация схемы перенастраиваемого универсального ближнепольного спектрометра. В этом случае оказывается возможным на одном приборе, обеспеченном пассивной виброзащитой, проводить исследования как прозрачных, так и непрозрачных объектов с использованием как апертурных, так и безапертурных зондов. Такая схема позволяет использовать ближнепольный спектрометр во всех режимах (на просвет и на отражение с возбуждением с помощью апертурного зонда, с совмещенными и отдельными каналами возбуждения и сбора излучения с помощью безапертурного зонда при работе с прозрачными и непрозрачными образцами) путем применения различных блоков возбуждения и сбора излучения, а также смены предметных столов и источников излучения.

Одним из ответственных элементов безапертурных ближнепольных микроскопов является металлический зонд с радиусом кривизны острия от единиц до нескольких десятков нанометров. Проанализированы существующие методы изготовления острий способом электрохимического травления, как наиболее распространенным, и на основе проведенного анализа предложено два метода изготовления металлических зондов из вольфрамовой проволоки. Первый способ заключается в травлении вольфрамовой проволоки в капле раствора щелочи в металлическом кольце на стабилизированном постоянном токе 6-12 мА – он обеспечивает получение острий с типичным радиусом 10-15 нм и конусностью около  $35^\circ$  (рис. 1). Такие острия по геометрическим параметрам подходят для работы в режиме электростатического усиления электромагнитного поля. Новизна предлагаемого метода заключается в подборе режима и формы капли, при которой капиллярные силы компенсируют большую часть веса отрывающейся части, что позволяет получать острия с радиусом менее расчетного, равного 50 нм. Вторым способом, заключающимся в травлении в объеме жидкости при переменном напряжении 3-6 В, обеспечивается получение острий с вершиной радиусом около 60 нм и конусностью  $15-20^\circ$ . Острия, полученные этим способом, подходят для работы с SERS частицей, прикрепленной к вершине. В обоих случаях используется прокаленная вольфрамовая проволока диаметром 0,15 мм и раствор 1М NaOH.

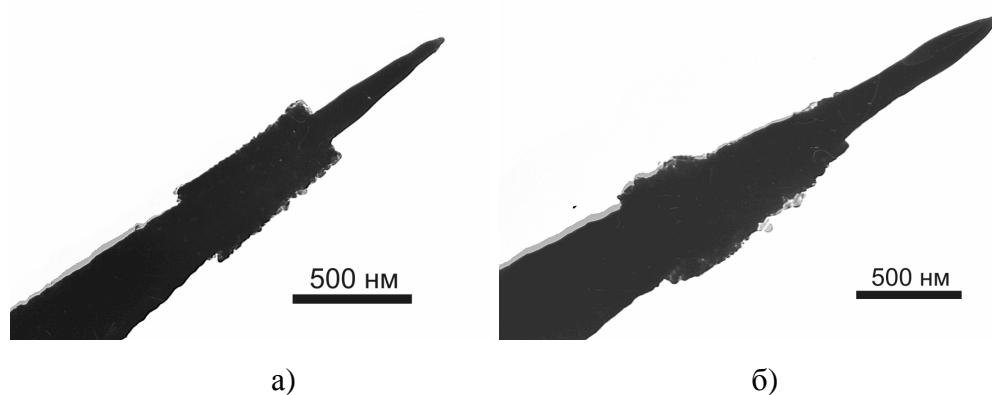


Рис. 1. Электронно-микроскопические изображения острий, полученных травлением в капле щелочи в кольце. а – радиус 14 нм, конусность  $35^\circ$ , длина 630 нм; б – радиус 11 нм, конусность  $37^\circ$ , длина 960 нм

Также рассмотрены вспомогательные способы улучшения параметров острий – травление в два этапа с промежуточным переворачиванием на  $180^\circ$ , исследовано влияние на травление капиллярных сил и рассмотрен вопрос удаления окислов с острия. Для достижения эффекта локального усиления оптических полей при резонансном возбуждении поверхностных плазмонов сформированные острия покрывались пленкой золота или серебра толщиной в несколько нанометров путем вакуумного испарения или электролитического осаждения. При этом геометрические параметры острий практически не изменялись.

Разработан способ регистрации оптической резонансной характеристики Ag и Au зондов, основанный на регистрации спектра рассеяния зонда и определении спектрального положения максимума рассеяния при погружении вершины острия в эванесцентное поле при полном внутреннем отражении (рис. 2). Это позволяет контролировать спектральные характеристики рассеяния зонда, т.к. положение максимума соответствует наиболее эффективной резонансной генерации плазмонов, локализованных на вершине зонда, и определить длину волны, на которой реализуется точный резонанс оптического возбуждения локальных плазмонов, а интенсивность рассеяния и люминесценции в пробном объекте, помещенном вблизи вершины зонда, достигает максимального значения. Использование нерадиационного эванесцентного поля для возбуждения локальных плазмонов позволяет уменьшить фоновые засветки и делает возможным получения спектров рассеивания.

Для воспроизводимого закрепления иглы под углом, нужным для реализации максимального усиления [5], предложено как формировать острия, так и наносить на них покрытия уже после прикрепления к ножке кварцевого резонатора. Также это уменьшает риск повреждения острия иглы или её металлического покрытия в процессе закрепления иглы.

Задача стабилизации расстояния между исследуемым образцом и зондом с острием на конце решена наиболее распространенным способом – измерени-

ем тангенциальной составляющей силы физического взаимодействия острия с образцом. Для измерения величины атомно-силового взаимодействия выбран электромеханический способ возбуждения и регистрации колебаний с помощью камертонного кварцевого резонатора, и исследовали режимы его работы, а также особенности реализации. Разработана схема синхронного детектора на основе устройства выборки-хранения, работающая на частоте 32 кГц, и на её основе – система регулирования расстояния «зонд-образец», позволяющая поддерживать расстояние в диапазоне 5-20 нм.

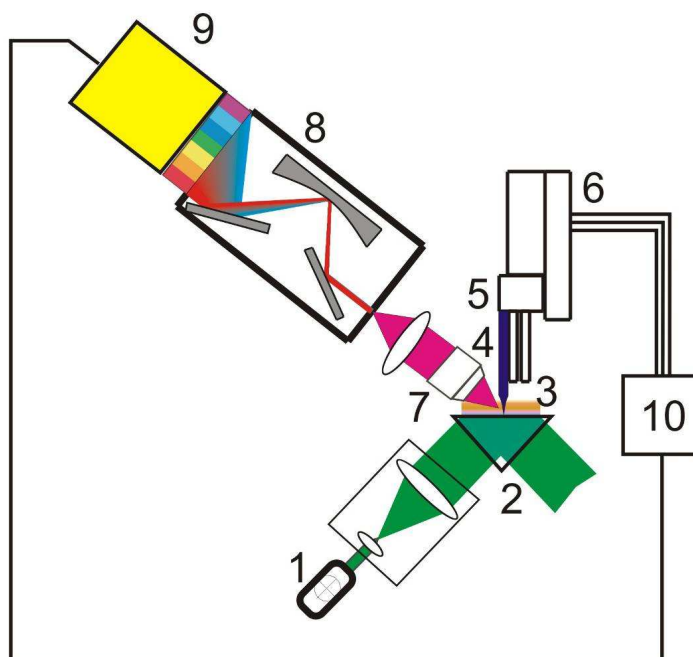


Рис. 2. Схема устройства для регистрации спектра излучения, рассеянного зондом при помещении его в эванесцентное поле. 1 – ксеноновая лампа, 2 – призма, 3 – эванесцентное поле, 4 – исследуемый зонд, 5 – трехкоординатный пьезосканатор, 6 – система обратной связи, 7 – микрообъектив, 8 – спектрограф, 9 – ПЗС-приемник, 10 – компьютер

При разработке рамановского спектрометра ближнего поля решена задача сопряжения двух систем позиционирования, изначально предназначенных для автономной работы – сканирующего пьезостолика Flatscanner (Nanonics) и атомно-силовой головки Smena (NT-MDT). Благодаря использованию ряда дополнительных возможностей, нам удалось через высоковольтный делитель подать управляющее напряжение атомно-силовой головки, являющееся усиленным топографическим сигналом, на аналоговый вход пьезостолика (рис.

3), позволив разделить часть функций между этими системами. В таком режиме атомно-силовая головка Smena обеспечивает горизонтальное перемещение зонда при юстировке, постоянно работающая система вертикального перемещения головки Smena обеспечивает постоянство расстояния зонд-образец (посредством механизма «shear-force»), а пьезостолик Flatscanner обеспечивает вертикальное перемещение образца при юстировке и горизонтальное перемещение во время сканирования. Общее управление сканированием образца, а также запись и обработка полученных данных в этом режиме производится системой управления пьезостоликом без необходимости разработки дополнительного программного обеспечения. Проведенное сопряжение позволило совместить плоскость образца, вершину зонда и центр сфокусированного лазерного луча, поддерживая вершину зонда в центре светового пятна при сканировании.

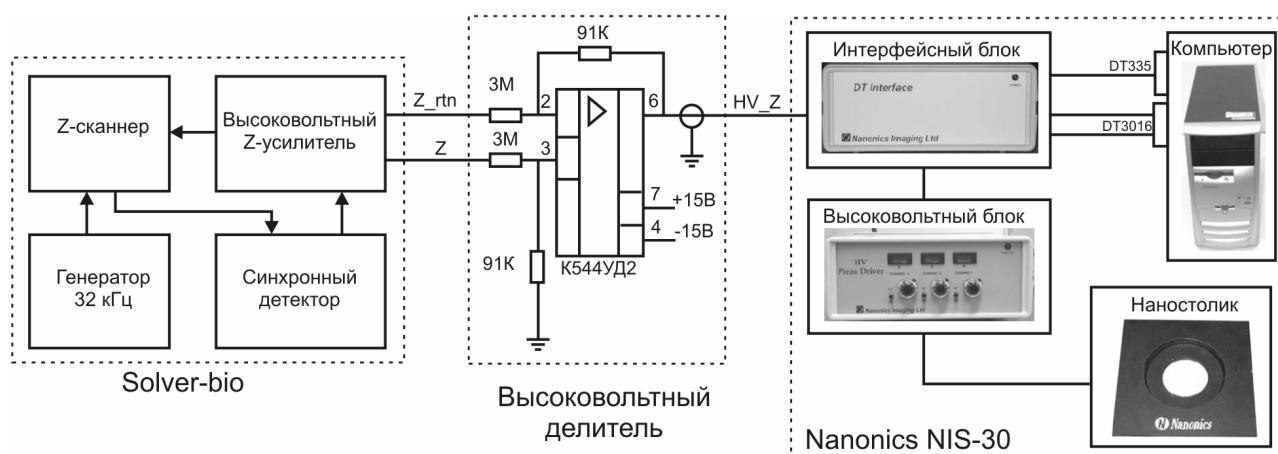


Рис. 3. Схема сопряжения блоков атомно-силового микроскопа Solver-Bio и пьезостолика Nanonics через высоковольтный делитель

Разрабатываемый ближнепольный спектрометр предназначен для получения рамановского изображения исследуемой наноструктуры с субдифракционным пространственным разрешением и создания на его основе карт химического состава. В его состав входит спектрометр Acton SpectraPro 2558 с многоканальной системой регистрации (ПЗС-линейка), которая позволяет сразу регистрировать достаточно большой участок спектра, но мало подходит для построения карт химического состава. Для получения пространственного распределения отдельных линий рамановского спектра разработан одноканальный

режим работы, в котором спектрометр Acton SpectraPro 2558 работает как монохроматор, а регистрация осуществляется охлаждаемым ФЭУ в режиме счета одиночных фотонов. Для реализации этого подхода предложены алгоритм управления и специализированное программное обеспечение, позволяющие согласовать работу монохроматора и счетчика фотонов в одноканальном режиме для регистрации спектров.

В качестве детектора нами выбран фотоэлектронный умножитель ФЭУ-106, как обладающий малым уровнем собственных шумов, хорошей одноэлектронной характеристикой, и большим динамическим диапазоном (до  $10^7$ ). Для усиления и счета одноэлектронных импульсов ФЭУ использованы широкополосный усилитель SR445A и счетчик фотонов SR400 (Stanford Research Co., США). Альтернативный вариант – однофотонные лавинные фотодиоды (SPCM-AQR, EG&G, Inc., Канада), отвергнут главным образом из-за большого уровня собственных шумов. Для счетчика SR400 критична не столько амплитуда импульса, сколько временное разрешение и скорость нарастания фронта импульса (менее 2 нс), поэтому особое внимание уделено согласованию нагрузок и стабилизации напряжения на последних каскадах ФЭУ. Разработанная система приема сигнала позволяет регистрировать сигнал начиная с уровня отдельных фотонов при уровне шума единицы фотонов/с (при охлаждении до  $-40^\circ\text{C}$ ).

Для согласования работы монохроматора и счетчика фотонов разработан алгоритм управления и специализированное программное обеспечение (на основе Microsoft Visual C++ 6.0 с использованием библиотеки MFC), позволяющие в одноканальном режиме регистрировать спектры рамановского рассеяния в диапазоне  $150\text{-}3000\text{ см}^{-1}$  со спектральным разрешением  $\sim 5\text{ см}^{-1}$  при работе с лазерами 532 и 633 нм (рис. 4), и люминесценции в диапазоне 400-900 нм, а также перестраивать монохроматор для регистрации разных характерных полос в спектрах образцов с нанометровым пространственным разрешением. Реализован вариант пошагового поворота дифракционной решетки со счетом сигнала в каждой точке, с выводом результатов на экран и возможностью сохранения данных. Возможно дальнейшее наращивание программных модулей, например,



для реализации функций записи двухмерного распределения сигнала по исследуемому участку.

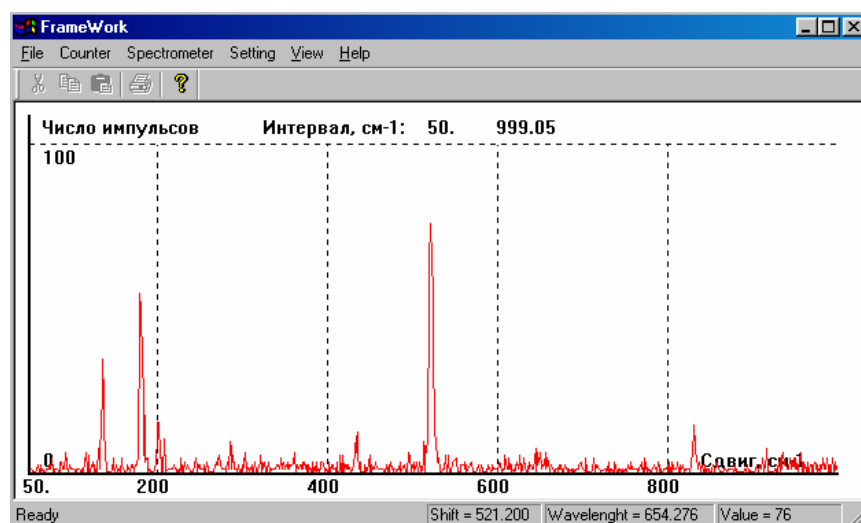


Рис. 4. Внешний вид окна программы управления. Приведен рамановский спектр кремния с характерной полосой на  $520 \text{ см}^{-1}$  с полушириной  $6 \text{ см}^{-1}$

Результаты исследования усиленного острием рамановского рассеяния (TERS) от Ge/Si куполообразных точек, проведенного на разработанном спектрометре ближнего поля, показывают возможность химического анализа отдельных точек размером менее 50 нм (рис. 5), что подтверждает работоспособность выбранных решений.

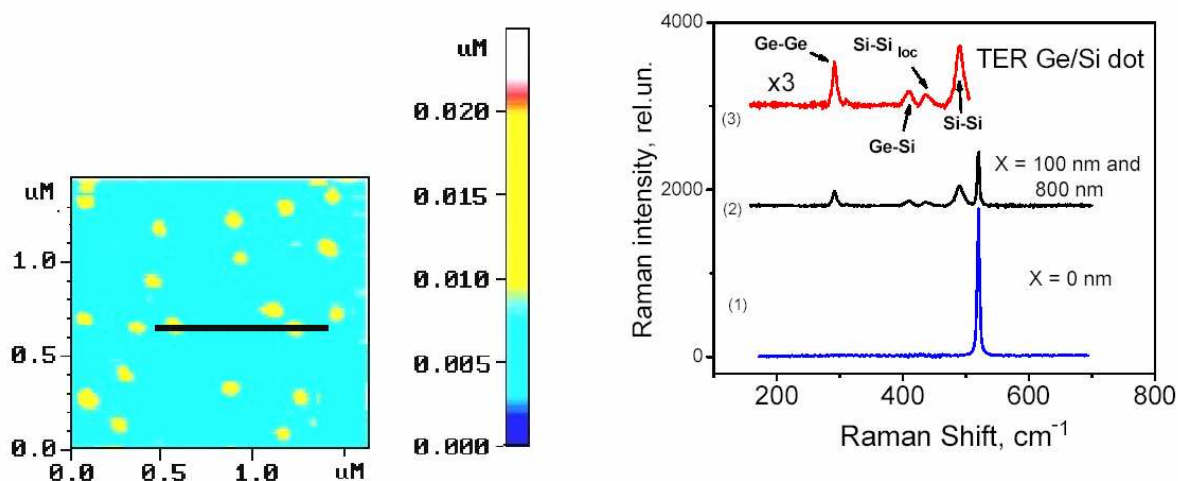


Рис. 5. Исследование рамановского рассеяния Ge/Si точек. а – атомно-силовое изображение образца, линия показывает направление перемещение острия; б – типичный набор рамановских спектров, полученных при разных положениях острия: (1) – начальная точка сканирования, (2) – область Ge/Si точек ( $x=100$  и  $800$  нм), (3) – TERS спектр  $\text{Ge}_{0.5}\text{Si}_{0.5}$  точки  $x=100$  со спектральным разрешением  $4 \text{ см}^{-1}$

**Третья глава** посвящена оптической микроскопии с дифракционным разрешением, а именно разработке аппаратуры для люминесцентного экспресс-контроля «биочиповых» структур – видеоанализаторов. Обычно биочип представляет собой нелюминесцирующую подложку, на которую нанесена матрица, содержащая от десятков до сотен ячеек диаметром порядка 100 мкм, расположенных на расстоянии нескольких сотен мкм друг от друга и содержащих иммобилизованные зонды. Люминесцентные видеоанализаторы должны обеспечивать регистрацию весьма слабого свечения отдельных ячеек, возникающего из-за связывания окрашенных образцов с зондами, на достаточно большом поле с их строгой координатной привязкой для диагностики с помощью ЭВМ.

Ранее в ГОИ им. С.И. Вавилова были разработаны портативные видеоанализаторы биочипов, но развитие и совершенствование биочиповой технологии и требование увеличения скорости анализа привело к изменению ряда параметров биочипов. В связи с увеличением числа одновременно анализируемых ячеек, приведшему к увеличению размеров матрицы с 3,5x4 мм<sup>2</sup> до 5x6 мм<sup>2</sup>, а также переходом на новый краситель (Cy5 вместо Texas Red), изменением предельных концентраций (10 амоль красителя на ячейку вместо 30 амоль) и изменением способа нанесения матрицы (что повысило требования к центрировке чипа), потребовалась разработка принципиальной схемы и создание опытного образца видеоанализатора изображений для микролюминесцентного анализа «биочиповых» структур с большим массивом одновременно анализируемых ячеек.

Для разработки модели, соответствующей современным требованиям, сформулированы технические требования и разработана принципиальная схема прибора (рис. 6). Предложенная система освещения предусматривает освещение матрицы биочипа двумя полупроводниковыми лазерами с длиной волны 655 нм и мощностью 25 мВт через волоконно-оптические жгуты с осветительными наконечниками в форме лопатки и со случайным расположением волокон

на торцах жгута, что позволяет достаточно равномерно осветить сравнительно большое поле матрицы биочипа и возбудить люминесценцию окрашенных ячеек. В результате тщательной настройки освещения удалось добиться равномерности люминесценции по полю матрицы в допустимых пределах  $\pm 15\%$ .

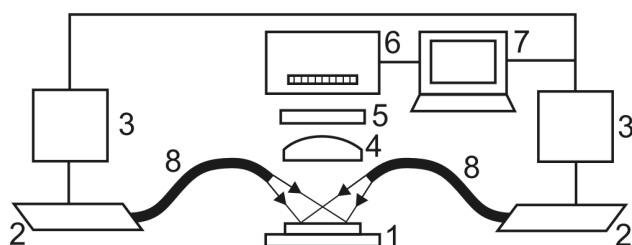


Рис. 6. Принципиальная оптическая схема люминесцентного видеоанализатора. 1 – кластер биочипа, 2 – лазеры, 3 – блоки питания, 4 – проекционный объектив, 5 – светофильтр, 6 – ПЗС-камера, 7 – компьютер, 8 – волоконно-оптические жгуты

Особое внимание уделено важнейшему элементу проекционной системы – объективу. В результате сопоставления нескольких вариантов по сложности и технологичности выбран специально разработанный широкопольный высокоапертурный зеркально-линзово-призменный объектив  $1 \times 0,35$ , поле зрения которого ( $6 \times 8$  мм) соответствует размеру матрицы биочипа. Разрешающая способность объектива составляет 80-300 лин/мм и достаточна для работы с ячейками диаметром 100 мкм, а рабочее расстояние 15 мм упрощает настройку осветительной системы. Запирающий светофильтр выбран с учетом большой апертуры светового пучка (0,35), и, благодаря высокой скрещенности, позволяет регистрировать весьма слабые сигналы, обеспечивая соотношение сигнал/фон не менее 10. Разработанная система загрузки чипа обеспечивает точность позиционирования не хуже 4,5 мкм. Пороговая чувствительность прибора определена на уровне примерно 10 амоль красителя Су5 на ячейку объемом 0,2 нл, что вполне удовлетворяет требованиям к прибору подобного класса.

Проведены успешные лабораторные и эксплуатационные испытания, в т.ч. с диагностическими туберкулезными чипами, определяющими лекарственно-устойчивые формы, что подтверждает работоспособность выбранного варианта построения анализатора.

**В заключении** сформулированы основные результаты выполненной работы:

1. Разработана принципиальная схема безапертурного рамановского и люминесцентного спектрометра ближнего поля, использующего эффект локального усиления оптических полей вблизи острия металлических зондов для исследования и характеристики как прозрачных, так и непрозрачных образцов с пространственным разрешением в 50 нм.
2. Разработан метод изготовления металлических зондов с радиусом острия менее 15 нм травлением на постоянном токе в капле электролита и исследованы особенности конкуренции гравитационных и капиллярных сил в процессе электрохимического травления.
3. Предложен метод определения резонансных оптических характеристик серебряных и золотых зондов для ближнепольного микроскопа, основанный на регистрации спектра рассеяния зонда и определении спектрального положения максимума рассеяния.
4. Разработана система регулирования расстояния «зонд-образец», позволяющая поддерживать расстояние в диапазоне 5-20 нм.
5. Разработана система сопряжения элементов взаимного позиционирования металлического острия и образца в поле лазерного излучения, позволяющая совместить плоскость образца, вершину зонда и центр сфокусированного лазерного луча.
6. Разработаны алгоритм управления, программное обеспечение и методика регистрации оптического сигнала спектрометра ближнего поля при работе в одноканальном режиме счета фотонов.
7. Предложен оригинальный метод возбуждения и детектирования люминесценции, позволяющий получать изображения и проводить параллельный микролюминесцентный анализ большого массива ячеек биочипа (15x20), разработана принципиальная схема видеонализатора, изготовлен опытный образец и проведены его испытания.

**ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ  
В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:**

1. Voronin Yu.M., Ivanov M.M., **Parfenov P.S.**, Toporcov S.A., Chentzov Yu.V. Near-field scanning tunneling optical microscope // Proceedings of The First scientific workshop-presentation «Optical micro- and nanotechnologies» / СПбГИТМО (ТУ), 2002. – С. 7-15.
2. **Парфенов П.С.**, Баштанов А.В., Воронин Ю.М. Регистрация сил бокового сдвига в ближнепольной микроскопии // Труды учебных заведений связи. – 2004, № 170. – С. 113-116.
3. Воронин Ю.М., Иванов М.М., **Парфенов П.С.**, Топорков С.А., Ченцов Ю.В. Ближнепольный сканирующий туннельный оптический микроскоп // Известия вузов. Приборостроение. – 2004, том 47, №12. – С. 45-49.
4. Агроскин Л.С., **Парфенов П.С.**, Барский И.Я., Воронин Ю.М., Барский В.Е. Люминесцентный видеоанализатор биологических микрочипов // Оптический журнал. – 2006, Т.73, №12. – С.47-50.
5. Баранов А.В., Виноградова Г.Н., Воронин Ю.М., Германова Н.М., Диденко И.А., Маслов В.Г., Орлова А.О., **Парфенов П.С.**, Перлин Е.Ю., Петров В.И., Топорков С.А., Федоров А.В. Способ регистрации резонансной характеристики металлического зонда ближнего поля для рамановского наноспектрометра // Патент РФ на изобретение № 2319118 от 24.05.2006.
6. Баранов А.В., Виноградова Г.Н., Воронин Ю.М., Германова Н.М., Диденко И.А., Маслов В.Г., Орлова А.О., **Парфенов П.С.**, Перлин Е.Ю., Петров В.И., Топорков С.А., Федоров А.В. Способ изготовления зонда для рамановского наноспектрометра // Заявка на изобретение № 2006134079 от 25.09.2006.
7. A.V. Baranov, A.V. Fedorov, Yu.M. Voronin, G.N. Vinogradova, **P.S. Parfenov**, A.A. Kim, T.S. Perova. TERS-based characterization of Si-Ge nanostructures // Abstract book of 5th International Conference on Silicon Epitaxy and Heterostructures, ICSI-5, May 20-24, 2007, Marseille, France. – 22P 2-02.
8. I.D. Rukhlenko, A.V. Fedorov, A.V. Baranov, Yu.M. Voronin, G.N. Vinogradova, **P.S. Parfenov**. Tip-enhanced secondary emission of semiconductor quan-

tum dots // Book of abstracts of Int. Conf. “Fundamentals of Laser Assisted Micro- & Nanotechnologies (FLAMN-07)”, St. Petersburg, Russia, June 25-28, 2007. – P. 92.

9. **Парфенов П.С.** Использование атомно-силового взаимодействия в люминесцентной нанооптике // 55-я научно-техническая конференция профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов: материалы / СПб ГУТ. СПб, 2003. – С. 101.
10. **Парфенов П.С.** Применение синхронного детектирования для измерения величины силы бокового сдвига в ближнепольной оптической микроскопии // 56-я научно-техническая конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов: материалы / СПбГУТ. СПб, 2004. – С. 92.
11. **Парфенов П.С.** Высокора разрешающее исследование люминесцентно меченых хромосом // 57-я юбилейная научно-техническая конференция профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов: материалы / СПбГУТ. СПб, 2005. – С. 118.
12. **Парфенов П.С.** Основные факторы, влияющие на процесс люминесценции молекул в ближнем поле // 58-я научно-техническая конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов: материалы / СПбГУТ. СПб, 2006. – С. 97.
13. **Парфенов П.С.** Организация сопряжения электронных блоков рамановского наноспектрометра // Сборник тезисов IV межвузовской конференции молодых ученых. – СПб: СПбГУ ИТМО, 2007. – С. 52.
14. **Парфенов П.С.** Реализация одноканального счета фотонов для рамановского наноспектрометра // Сборник тезисов V межвузовской конференции молодых ученых. – СПб: СПбГУ ИТМО, 2008. – С. 240.

**Список цитируемой литературы**

1. Raman Microscopy. Developments and Applications / Edited by: George Turrell and Jacques Corset. – США, Elsevier, 1996. – P. 453.
2. Мирзабеков А.Д., Прокопенко Д.В., Чечеткин В.Р. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине. // В кн.: Информационные медико-биологические технологии / под ред. В.А. Княжева и К.В. Судакова. – ГЭОТАР-МЕД, Москва, 2002. – С. 166-198.
3. Барский В.Е., Колчинский А.М., Лысов Ю.П., Мирзабеков А.Д. Биологические микрочипы, содержащие иммобилизованные в гидрогеле нуклеиновые кислоты, белки и другие соединения: свойства и приложения в геномике // Молекулярная биология. – 2002, Т.36, №4. – С. 563-584.
4. Progress in Nano-Electro-Optics I: Basics and Theory of Near-Field Optics / Ed. Ohtsu M. // Springer Series in Optical Sciences. – 2003, Vol. 86. – P. 159.
5. Pettinger B., Picardi G., Schuster R., Ertl G. Surface-enhanced and STM tip-enhanced Raman spectroscopy of CN ions at gold surfaces // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2003, vol. 554. – P. 293-299.