

УДК 579.842.11:57.042:53.047:53.05.

СИСТЕМА ДЕТЕКЦИИ БИОАНАЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

© 2012 г. **Е.В. Сысоев³, А.К. Поташников³, Ю.В. Обидин³,
Т.Н. Горячкова¹, В.С. Базин³, В.М. Попик², С.Е. Пельтек¹, Н.А. Колчанов^{1, 4, 5}**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

² Институт ядерной физики СО РАН, Новосибирск, Россия;

³ Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: potash@tdisie.nsc.ru;

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия;

⁵ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Поступила в редакцию 15 июля 2012 г. Принята к публикации 1 августа 2012 г.

Разработана и создана система детекции для определения наличия антител/антигенов в биологических жидкостях. Система предназначена для регистрации кинетики свободной иммунодиффузии флюоресцентных наноконструкций в каналах микрофлюидного модуля биоаналитического комплекса нового поколения. Система состоит из четырех параллельных каналов возбуждения, системы регистрации флюоресценции и программы обработки изображения. Система позволяет регистрировать наличие антител/антигенов в биологических жидкостях в концентрациях менее чем 0,1 мкг/мл.

Ключевые слова: биоаналитические комплексы, биобезопасность, микрофлюидная система.

ВВЕДЕНИЕ

Большинство исследований в биологии и химии в течение всей их истории проводились макроскопическими методами – в колбах, пробирках, чашках Петри. Прогресс микроэлектроники всего за несколько десятков лет привел к впечатляющей миниатюризации вычислительных приборов: от огромных приборов, занимающих целые комнаты, до миниатюрных микросхем. В связи с этим у многих исследователей возникла идея ввести сходные технологии в химию и биологию, что и стало началом микрофлюидных технологий. Ограничивающим фактором в системе микрометровых размеров являются возможности человека эффективно манипулировать биологическими объектами.

В настоящее время в мировой науке происходит технологическая революция, основанная

на использовании микрофлюидных систем, направленная на переход к малым и сверхмалым размерам устройств для изучения функции биологических макромолекул, геномов, клеток, клеточных структур, а также для фармакологии, клинической диагностики, биохимических исследований, аналитической и индустриальной химии и др.

Главной характеристикой микрофлюидных систем является возможность оперировать микро- и нанообъемами анализируемых жидкостей. Основной целью данной работы являются разработка и создание системы детекции для биоаналитического комплекса нового поколения, основанного на соединении технологии микрофлюидных систем и процесса свободной иммунодиффузии флюоресцентных наноконструкций антиген/антитело для снижения стоимости клинических анализов крови за счет уменьшения объемов дорогостоящих реагентов,

биоопасных отходов и уменьшения издержек при массовом производстве.

В биоаналитическом комплексе в каналах микрофлюидной системы происходит реакция свободной иммунодиффузии, регистрация которой осуществляется путем измерения интенсивности флюоресцентного сигнала с помощью цифровой камеры и последующей цифровой обработки полученных изображений (Пельтек и др., в печати).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Структура системы детекции

Структура системы детекции (СД) сигнала интенсивности флюоресценции представлена на рис. 1. В ее состав входят:

- твердотельный лазер на основе лазерного диода;
- оптическая система ОС-1, обеспечивающая формирование светового пучка и фильтрацию спонтанного излучения лазера;
- оптическая система ОС-2, представляющая собой делитель лазерного луча на четыре параллельных пучка;
- оптическая система ОС-3, состоящая из объектива и набора светофильтров;
- цифровая камера;
- компьютер с программным обеспечением.

Система предназначена для возбуждения флюоресценции в микрофлюидном модуле и количественной оценки ее величины как функции времени. ОС-2 создана на основе светоделительных кубиков с целью придания возможности адаптации к конкретному микрофлюидному модулю.

2. Оптическая схема системы детекции

Оптическая схема СД биоаналитического комплекса приведена на рис. 2.

Лазер 1 является источником света для возбуждения флюоресцентного сигнала флюоресцентных наноконплексов «антиген–антитело» в каналах микрофлюидного модуля. Основными требованиями, предъявляемыми к лазеру, являются узкая спектральная полоса возбуждения и достаточно высокая мощность излучения в заданном спектральном диапазоне. Лазер может работать в непрерывном и импульсном режимах и имеет длину волны излучения 473 нм.

Интерференционный светофильтр 2 с узкой полосой пропускания, центр которой совпадает с основной длиной волны лазера, служит для устранения спонтанного излучения лазера в полосе частот спектра люминесценции. Объектив 3 обеспечивает формирование пучка лазера с требуемым размером поперечного сечения (50 мкм) в рабочей плоскости микрофлюидного модуля. Поворотная призма 4 служит для юстировки лазерного пучка.

Светоделительные кубики предназначены для формирования четырех лазерных пучков для возбуждения флюоресцентных наноконплексов параллельно в четырех точках детекции микрофлюидного модуля. Светоделительные кубики установлены таким образом, чтобы плоскость светоделительных граней была параллельна падающему в кубики лазерному пучку. Светоделительные грани первого и второго светоделительных кубиков повернуты на 90° относительно друг друга вокруг оси падающего лазерного пучка. Такое расположение светоделительных кубиков позволяет получить

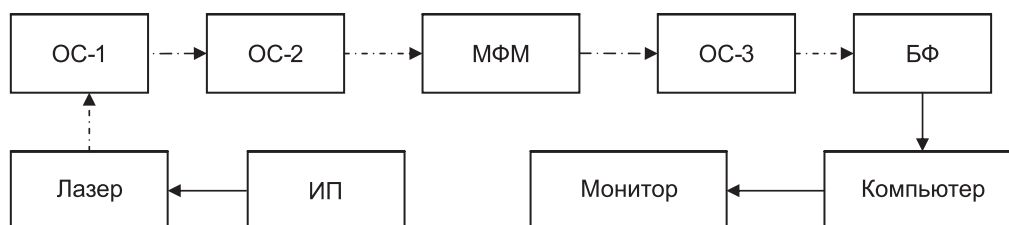


Рис. 1. Структура системы детекции.

ОС-1 – оптическая система 1, ОС-2 – оптическая система 2, МФМ – модуль микрофлюидный; ОС-3 – оптическая система 3; БФ – блок фотоприемников (видеокамера); ИП – источник питания.

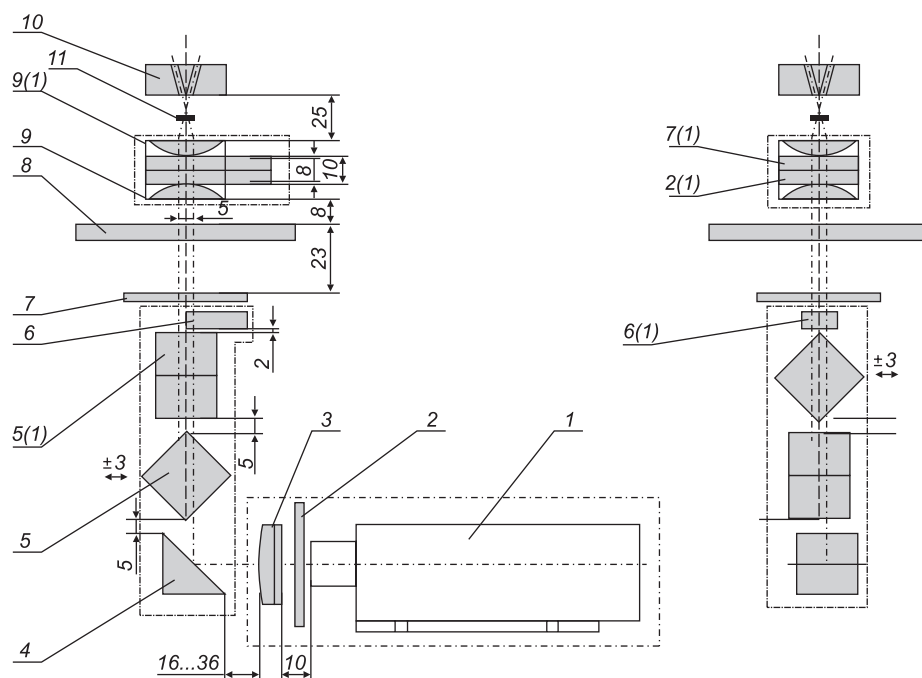


Рис. 2. Оптическая схема системы детекции.

1 – лазер; 2 – интерференционный фильтр, отсекающий спонтанное излучение; 3 – формирующий объектив; 4 – поворотная призма; 5 – два светоделительных кубика; 6 – две юстировочные пластинки; 7 – поляризационный светофильтр; 8 – микрофлюидный модуль; 9 – фокусирующий объектив; 10 – блок фотоприемный; 11 – поляризационный светофильтр; 12 – интерференционный светофильтр.

из одного лазерного пучка четыре, идущих параллельно друг другу.

Поляризационный светофильтр 7 обеспечивает узкую линию возбуждения флюоресценции наноконплексов. Плоскопараллельные стеклянные пластинки 6 позволяют выполнить тонкую подстройку координат точек детекции в микрофлюидном модуле. Объектив 9 предназначен для фокусировки излучения люминесценции на фотоприемном блоке 10. Конструктивно в объектив 9 встроены поляризационный фильтр 7(1) и узкополосный интерференционный режекторный фильтр 2(1).

Спектр отфильтрованного лазерного излучения приведен на рис. 3.

Работа оптической схемы. Пучок света, выходящий из лазера 1, проходит через интерференционный светофильтр 2, объектив 3 и после призмы 4 светоделительными кубиками 5 преобразуется в четыре идущих параллельно друг другу лазерных пучка. Далее два из четырех пучков проходят через две юстировочные пластинки 6. После этого все четыре пучка проходят поляризационный фильтр 7.

Таким образом, на микрофлюидный модуль попадают четыре идущих параллельно друг другу лазерных пучка, сфокусированных в строго определенных точках детекции в каналах микрофлюидного модуля. Свет лазерных пучков и флюоресценции попадает в объектив 9. Излучение лазера подавляется фильтрами, а флюоресцентное излучение проходит на выход объектива и фокусируется в заднем фокусе объектива, в плоскости которого установлена видеокамера.

На рис. 4 и 5 приведены спектры возбуждения флюоресцентных наноконплексов с различными типами квантовых точек.

Разнесение точек фокусировки излучения лазера и флюоресценции вдоль оптической оси позволяет уменьшить плотность мощности лазерных пучков в задней фокальной плоскости объектива 9 в 10^2 – 10^3 раз. В совокупности лазерное излучение подавляется в 10^{14} – 10^{15} раз. Если мощность лазера составляет 0,04 Вт, то в задней фокальной плоскости объектива 9 она составляет менее 10^{-16} – 10^{-17} Вт на каждый из четырех лазерных пучков.

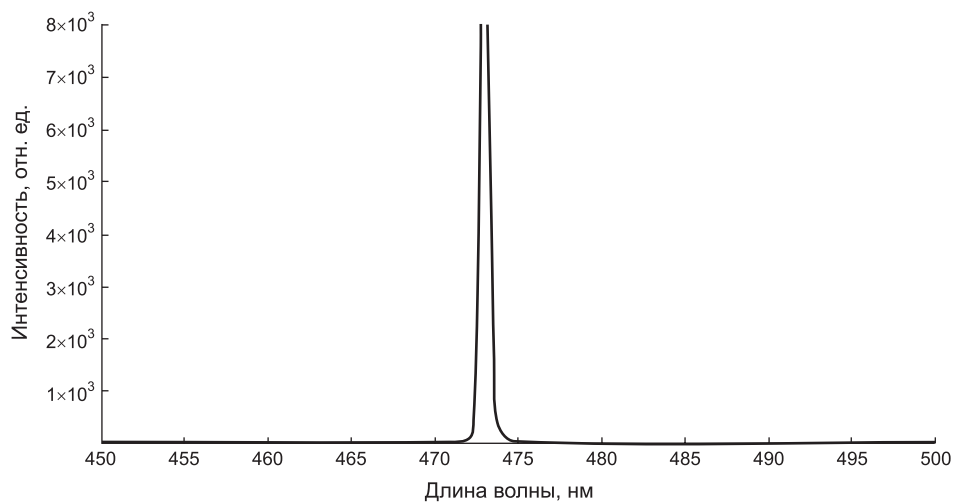


Рис. 3. Спектр фильтрованного излучения лазера.

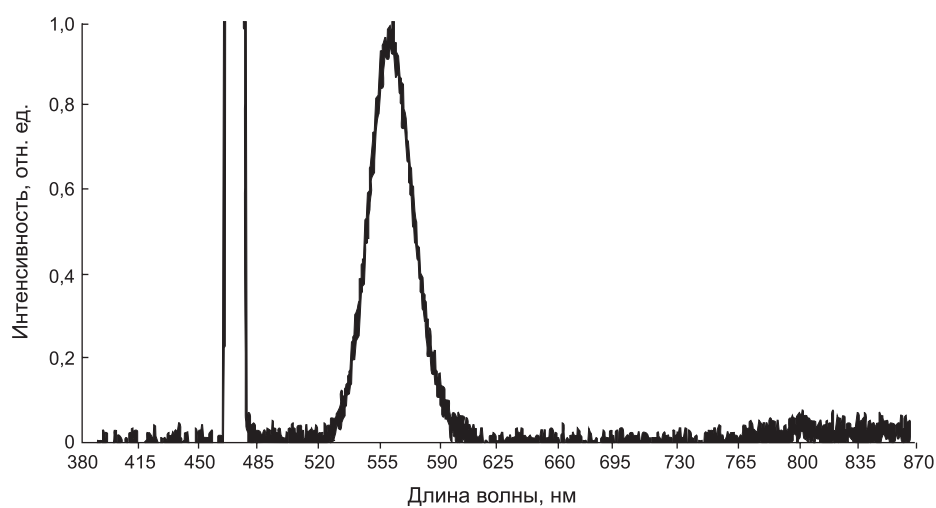


Рис. 4. Спектры возбуждения и флуоресценции наноконплексов с квантовыми точками Qtracker 565.

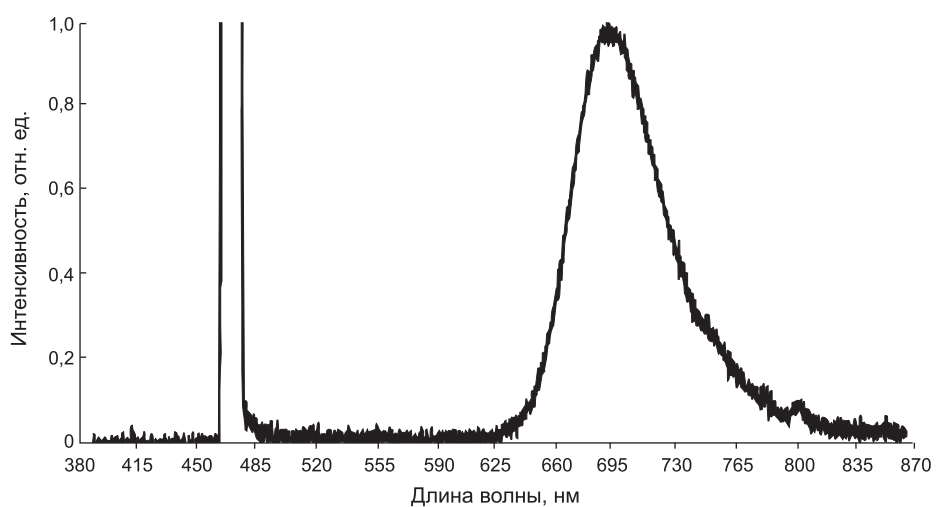


Рис. 5. Спектры возбуждения и флуоресценции наноконплексов с квантовыми точками Qtracker 705.

3. Фотоприемник

В качестве фотоприемника используется цифровая видеокамера Видеоскан-415Ц-2001 с CCD-матрицей размером $1/2''$ ($6,5 \times 4,83$ мм). Разрешение камеры – 782×582 пикселей, размер пикселя $8,3 \times 8,3$ мкм. Динамический диапазон – 1000, имеется возможность 12-разрядного представления элементов изображений. Программируемое время экспозиции – от 3,5 мкс до 10 мин. Видеокамера в непрерывном режиме или в режиме принудительного запуска регистрирует изображения каналов микрофлюидного модуля.

Обработка изображений цифровой камеры

Для изображений люминесцирующих объектов характерны яркостные перепады по отношению к темному фону. Для идеального изображения уровень фона соответствует уровню черного в сигнале. В зависимости от интенсивности свечения флюоресцирующие объекты могут перекрывать все яркостные градации динамического диапазона. Для слабосветящихся объектов минимальный уровень сигнала соответствует уровню собственных шумов фотоприемника и маскируется им.

Методы внутрикадровой цифровой обработки (Прэтт, 1982) для таких изображений оказываются неэффективными. Так, например, операции сглаживания вместе с некоторым подавлением шумов приводят к «размытию» яркостных перепадов, а медианная фильтрация устраняет только одиночные шумовые выбросы.

Изображения фотолюминесцирующих объектов статичны, поэтому для улучшения их качества можно применять межкадровую обработку. Весьма эффективен в этом случае метод цифрового шумоподавления (Цифровое телевидение ..., 1980), позволяющий уменьшить шум в изображении за счет усредняемых (накапливаемых) кадров изображения. Без цифрового шумоподавления невозможно получение качественного изображения флюоресцирующего объекта, поэтому данную операцию следует отнести к разряду обязательных функций.

Изображение может быть дополнительно улучшено за счет контрастирования методом преобразования яркостей, сущность которого заключается в перераспределении значений

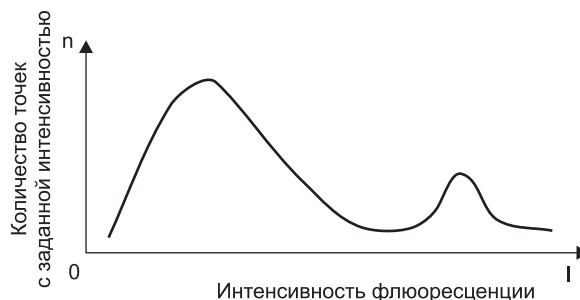


Рис. 6. Гистограмма изображения флюоресцирующего объекта.

яркостей исходного изображения в пределах заданного динамического диапазона. Для определения границ диапазона яркостей исходного изображения обычно используется гистограмма их распределения. Для интенсивно флюоресцирующих объектов гистограмма имеет два ярко выраженных пика, соответствующих наиболее часто встречающимся значениям фона и сигнала (рис. 6).

Яркостная коррекция с целью удаления фона необходима всегда при дальнейшем автоматизированном количественном анализе и весьма полезна для визуального контроля с целью улучшения субъективного восприятия изображения (Корнышев, Тимофеев, 2007).

Система детекции работает под управлением программы «BioChip».

Программа имеет встроенные средства для калибровки и поверки характеристик цветопередачи. Результаты калибровки сохраняются в файле параметров и автоматически корректируют передаточную функцию камеры.

Главное окно программы представлено на рис. 7.

Программно реализованы два режима выделения зоны флюоресценции: пороговая обработка и заранее задаваемая зона произвольного диаметра. Программа определяет следующие оценки зарегистрированной флюоресценции:

- количество светящихся точек изображения;
- суммарную яркость флюоресцирующих точек;
- среднюю длину волны флюоресценции;
- насыщенность цвета.

Кроме того, программа строит гистограмму результирующего изображения, показывает

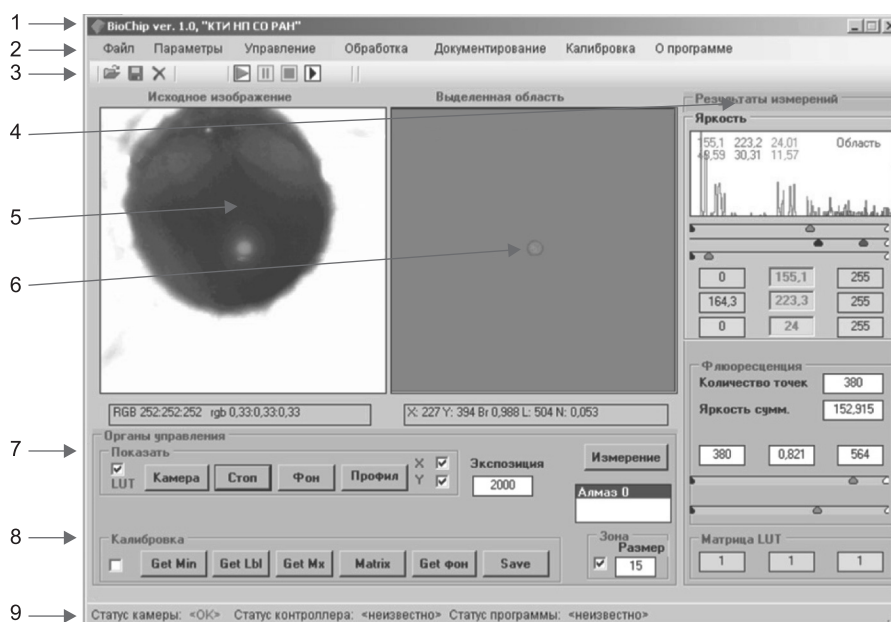


Рис. 7. Главное окно программы BioChip.

1 – заголовок окна, 2 – главное меню, 3 – панель инструментов, 4 – группа элементов для отображения результатов измерений, 5 – окно исходного изображения, 6 – окно обработанного изображения, 7 – группа органов управления, 8 – группа средств калибровки, 9 – строка состояния.

среднее значение яркости по трем цветовым координатам (R, G, B), отображает установленные пороги по яркости, насыщенности и длине волны, которые используются при выделении точек флюоресценции.

На рис. 7 видны два окна изображений. В первом (левом) представлено исходное изображение, регистрируемое камерой. Используя набор задаваемых оператором параметров, программа автоматически выделяет из всего изображения область детекции, в которой осуществляется реакция свободной иммунодиффузии. В правом окне показаны результаты обработки.

Результаты содержат: гистограмму яркости, цифровые индикаторы значений яркости по каждой из цветовых координат (R, G, B), индикатор количества выделенных точек изображения, индикатор суммарной яркости всех точек, а также индикаторы значения насыщенности и длины волны доминирующего цвета.

Алгоритм работы программы «BioChip»

Процедура пороговой обработки изображения выделяет точки детекции. При пороговом

выделении точек флюоресценции программа для каждой из точек изображения последовательно выполняет 6 операций:

1. Вычисление квадрата расстояния от центра кадра (x_0, y_0) до обрабатываемой точки (x_i, y_i) $R^2 = (x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2$ и сравнение его с заданным значением, что позволяет исключить из рассмотрения точки, расположенные за пределами заданного радиуса от центра кадра.

2. Вычитание из яркости каждой точки, представленной значениями цветовых составляющих (R_i, G_i, B_i), значения яркости фона в этой же точке: $R_i = R_i - R_{cp}$; $G_i = G_i - G_{i\phi} + G_{cp}$; $B_i = B_i - B_{i\phi} + B_{cp}$. К полученному значению добавляется средний уровень фона для сохранения уровня яркости. Вычитание фона позволяет более точно вычислять интегральные характеристики точек флюоресценции.

3. Определение суммарной яркости точки ($Bright = R_i + G_i + B_i$) и сравнение ее с порогом. Операция выбраковывает яркие точки, не связанные с точками детекции, и позволяет исключать дефекты и блики в изображении.

4. Сравнение яркости по каждому из цветов с нижним и верхним порогами. Пороги могут быть заданы оператором на этапе настройки.

Это позволяет исключать дефекты и блики в разных цветах.

5. Вычисление насыщенности цвета для каждой выделенной точки изображения:

$$N = \sqrt{(R_i - R_s)^2 + (G_i - G_s)^2 + (B_i - B_s)^2}$$

и сравнение ее с порогами. Здесь (R_s, G_s, B_s) – координаты источника освещения (по умолчанию вычисляются из фона).

6. Определение доминирующей длины волны, при использовании значений точек локуса, заданных таблично. При обращении к таблице необходимо знать текущие цветовые координаты (R_i, G_i, B_i) и координаты источника (R_s, G_s, B_s) .

На основе полученных локальных характеристик отдельных флуоресцирующих точек

(яркость, насыщенность, длина волны) находится среднее значение и среднее квадратическое отклонение (СКО). Высокий уровень СКО свидетельствует о возможной недостоверности оценок. Средние значения характеристик представляются оператору на экране монитора.

Любую из 6 указанных выше операций пороговой обработки можно исключить, используя меню или опции программы.

Результаты экспериментальной проверки системы детекции

Для получения количественной оценки чувствительности канала регистрации был ис-

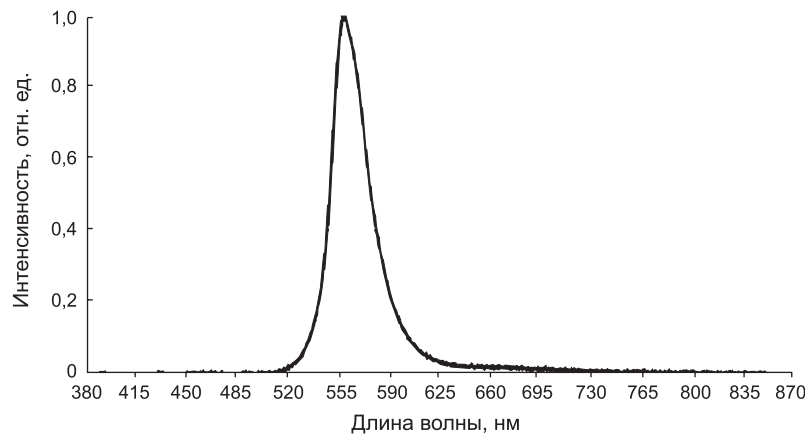


Рис. 8. Спектр излучения имитатора.

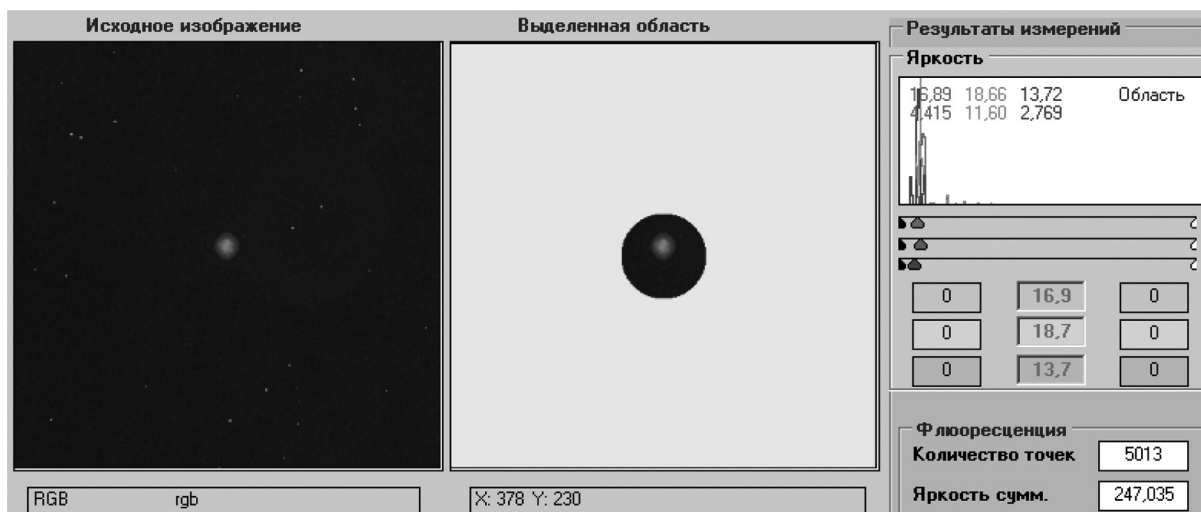


Рис. 9. Изображение светящейся точки с 2 фильтрами.

Ослабление 6400, экспозиция 20 с.

пользован специально изготовленный имитатор источника флюоресценции, спектр которого близок к спектру флюоресценции квантовых точек (рис. 4, 5).

Имитатор представляет собой светодиод с калиброванной диафрагмой диаметром 50 мкм. Он обеспечивает световую мощность $8 \cdot 10^{-9}$ Вт. В связи с низкой мощностью излучения она измерялась методом сравнения и интегрирования спектральных яркостей в заданном диапазоне длин волн. Для получения спектральных характеристик использовался сертифицированный спектрофотометр «Колибри-2» компании «ВМК-Оптоэлектроника». Спектр имитатора приведен на рис. 8.

Светимость имитатора соответствовала освещенности в плоскости изображений $\sim 0,1$ лк. Такая освещенность примерно в 10 раз превышает предельную чувствительность человеческого глаза. Эталон снимался через 1 и 2 нейтральных светофильтра с пропусканием 1:80. Полученные изображения приведены на рис. 9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и апробирована система детекции для функционирования в составе биоаналитического комплекса нового поколения, основанного на соединении метода свободной иммунодиффузии и микрофлюидных технологий. Чувствительность системы составляет $1,6 \cdot 10^{-6}$ лк, что позволяет определять наличие антител/антигенов в биологических жидкостях в концентрациях менее чем 0,1 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

- Пельтек С.Е., Горячковская Т.Н., Банникова С.В. и др. Исследование реакции свободной иммунодиффузии в каналах микрофлюидного модуля // Автометрия. (В печати).
Прэтт У. Цифровая обработка изображений. М.: Мир, 1982. Кн. 1. 312 с.
Цифровое телевидение / Под ред. М.И. Кривошеева. М.: Связь, 1980. 259 с.
Корнышев Н.П., Тимофеев А.В. Компьютерное моделирование телевизионных систем визуализации люминесцирующих малоcontrastных объектов // Вопр. радиоэлектроники. Сер. Техника телевидения. 2007. Вып. 1. С. 43–47.

DETECTION SYSTEM OF A NEW-GENERATION BIOANALYTICAL DEVICE

**E.V. Sysoev³, A.K. Potashnikov³, Y.V. Obidin³, T.N. Goryachkovskaya¹, V.S. Bazin³,
V.M. Popik², S.E. Peltek¹, N.A. Kolchanov^{1, 4, 5}**

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;

² Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS, Novosibirsk, Russia;

³ Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: potash@tdisie.nsc.ru;

⁴ Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

⁵ National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

Summary

We designed and manufactured a system for detection of antibodies/antigenes in biological fluids. This system records the kinetics of free immunodiffusion of fluorescent nanocomplexes inside the channels of a microfluid module of a new-generation bioanalytical device. The system consists of four parallel excitation channels, a system for fluorescence detection, and an image-processing program. Antibody/antigen concentrations below 0,1 $\mu\text{g/ml}$ can be detected in biological fluids.

Key words: bioanalytical devices, biosafety, microfluid system.