

### ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

*С.А. Клотченко, Ж.-М. Байанга, М.А. Плотникова,  
А.А. Саканцев, А.В. Васин, В.А. Готлиб, В.А. Елохин*

#### **Анализатор для регистрации и обработки флуоресцентных изображений биочипов**

##### **Аннотация**

Описана технология создания отечественной инструментальной платформы для клинической лабораторной диагностики с использованием биочипов. Предложенный аппарат представляет собой флуоресцентный анализатор для регистрации изображений флуоресцирующих биочипов при возбуждающем освещении на длинах волн 520 и 633 нм и последующего расчета интенсивности флуоресценции полученных изображений.

##### **Введение**

Основной областью применения разрабатываемого анализатора биочипов [1] является проведение различных видов медицинских исследований, заключающихся в одновременной диагностике нескольких различных параметров (например, совокупности уровней определенных белков в сыворотке крови). На сегодняшний день на рынке представлены различные анализаторы биочипов, предлагаемые такими ведущими компаниями-производителями аналитических приборов для медицины, как, например, «Agilent» (США), «PerkinElmer» (США), «Roche» (Швейцария), «CapitalBio» (Китай), «Innopsys» (Франция), «Arrayit» (США) и другими, в том числе российскими компаниями.

Ключевым элементом для реализации флуоресцентного анализатора биочипов является его фотоприемное устройство, отвечающее за регистрацию возбуждаемой флуоресценции и определяющее схему построения прибора [2], [3]. С учетом того, что в результате флуоресценции излучаются предельно малые световые потоки, для создания анализатора биочипов возможно применять следующие виды фотоприемников: фотоэлектронный умножитель (ФЭУ), высокочувствительный линейный фотоприемник (CCD или CMOS) или высокочувствительный матричный CMOS.

Использование ФЭУ обеспечивает достижение предельно высокой чувствительности измерений. Однако в силу того, что ФЭУ являются одноэлементными фотоприемниками, для регистрации всего изображения биочипа необходимо обеспечить прецизионное двухкоординатное сканирование (сканирование по осям X и Y) и широкоугольную конфокальную светосильную оптическую систему [4]. В результате реализации данных требований оптико-механическая конструкция анализатора, использующего в качестве фоточувствительного элемента ФЭУ, получается дорогостоящей и сложной в реализации, также увеличиваются габаритные размеры и вес прибора. Кроме

того, для сканеров такого типа время полноразмерного анализа одного биочипа (размером 25,4 × 76,2 мм) в высоком разрешении составляет 5...10 мин, что зачастую оказывается слишком долгим для потребителей в лице клиник и научных институтов медико-биологического профиля.

При построении фотоприемника флуоресцентного анализатора на основе сенсоров типа CCD или CMOS [5], [6] есть возможность обеспечить достаточно быстрое полноразмерное сканирование такого же биочипа путем его механического перемещения только по одной оси.

Таковыми сенсорами могут быть, например, сенсоры IMX264LLR-C («Sony», Япония) или MT9J003STM («On Semiconductor», США), используемые в видеокамерах UI-3280CP-M-GL и UI-1491xLE соответственно (обе камеры производятся компанией «iDs», Германия); сенсор «CMOS FL400» («Fairchild», США), используемый в видеокамерах типа «ORCA Flash4.0 C11440-52U» и «C11440-42U» («Hamamatsu», Япония) или в видеокамерах «Zyla 4.2 PLUS» («Andor», Ирландия).

Для обеспечения высокого разрешения и быстродействия анализатора необходимо также применять высококачественную широкоугольную оптику, прецизионное сканирование и сложную высокочастотную электронику для управления линейными CCD или CMOS.

##### **Материалы и методы**

Наиболее перспективным подходом для создания флуоресцентного анализатора представляется использование высокочувствительного матричного CMOS-фотоприемника вследствие относительной простоты реализации, сравнительно малого времени сканирования биочипа и оптимальной ценовой конфигурации структурных компонентов.

В качестве источников излучения были выбраны лазерные диодные модули компании «LasersCom» (Белоруссия): для возбуждения флуоресценции люминофора Су3 применяется лазер-

ный диодный модуль LDI-520-FP-20 с пиковым излучением на длине волны 520 нм и мощностью 20 мВт, для флуорофора  $Cu5$  – LDI-633-FP-50 с длиной волны 633 нм и мощностью 50 мВт.

Флуоресценция регистрируется высокочувствительной CMOS-видеокамерой UI-1491xLE-M компании «iDs» (Германия). Благодаря широкоформатному разрешению 10 Мп с пикселем 1,67 мкм и полудюймовой матрице становится возможным получить детализированное изображение размером 20 мкм. Также время выдержки фотографирования 14,5 с и 8,5-кратное аппаратное усиление позволяют зафиксировать интенсивность излучения малых порядков, которую испускают споты с малой концентрацией флуорофора. Изображение биочипа на матрице камеры формирует 10 Мп-объектив с постоянным фокусным расстоянием 25 мм LM25JC10M производства компании «Kowa» (Япония), к которому прикреплен блокирующий интерференционный двухполосный светофильтр FF01-577/690-25 («Semrock», США) с пиками пропускания на длинах волн 577 и 690 нм, имеющий высокую оптическую плотность в спектральной области блокировки, высокое пропускание в рабочем спектральном диапазоне, а также большую крутизну фронтов. Также использование интерференционного фильтра позволяет исключить механическое переключение блокирующих светофильтров при работе на разных длинах волн. В качестве системы перемещения для получения общего изображения шивкой отдельных кадров при сканировании по оси X используется линейный привод типа 8MT50 производства компании «Standa» (Литва) с разрешающей способностью на полном шаге 5 мкм и система обратной связи в виде абсолютного линейного энкодера серии ЛИР-ДА («СКБ ИС», Россия). Для получения изображения биочипа в белом свете используются яркие светодиоды белого свечения GNL-5053UWC. Остальные компоненты анализатора были спроектированы и изготовлены на производственном участке АО «Научные приборы».

Для регистрации флуоресценции на разрабатываемом анализаторе использовали биочипы, выполненные в формате микробиологического стекла. В качестве объектов сканирования использовали коммерческий калибровочный слайд («Full Moon BioSystems», США), а также лабораторные образцы биочипов, изготовленные в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

## Результаты и обсуждение

### Дизайн флуоресцентного анализатора

Анализатор состоит из аналитического блока, при помощи которого производится полный цикл сканирования биочипов, и компьютера с установленным программным обеспечением для управления процессом сканирования и анализа полученных результатов (рис. 1).

В состав аналитического блока входят оптико-механический блок и электронный блок (модуль управления). Оптико-механический блок содержит: механическую систему перемещения, состоящую из выдвигающегося столика для установки биочипа, закрепленного на линейном приводе; оптическую регистрирующую систему, состоящую из CMOS-видеокамеры с объективом и закрепленным на нем двухполосным интерференционным светофильтром, которая располагается перпендикулярно исследуемому образцу на стойке с возможностью регулировки высоты; систему возбуждения флуоресценции и освещения, включающую в себя лазерные диодные модули с рабочими длинами волн 520 и 633 нм, торцы волоконных выходов которых закреплены таким образом, чтобы иметь возможность изменять угол наклона их положения для создания необходимой картины освещения флуоресцентного биочипа, и светодиоды подсветки, также обладающие возможностью изменения угла их положения для равномерного освещения рабочей области. Электронный блок содержит платы управления линейным приводом, лазерные диодные модули, а также их блоки питания. Оптический узел построен таким образом, чтобы исключить возможность попадания возбуждающего флуоресценцию излучения на матрицу видеокамеры. Корпус аналитического блока является свето-, пыли- и влагонепроницаемым.

Установленное на компьютере программное обеспечение (ПО) реализует управляющие функции, такие как управление режимами работы видеокамеры, сканирование биочипа, регулировка интенсивности лазеров и светодиодов, контроль ввода изображения и механического сканирования, и вычислительные функции, как, например, выделение области флуоресценции, очистка изображения, измерение уровня флуоресценции в выделенных областях, отображение данных в формате 16 бит псевдоцветами, а также хранение и архивирование изображений и результатов измерений.

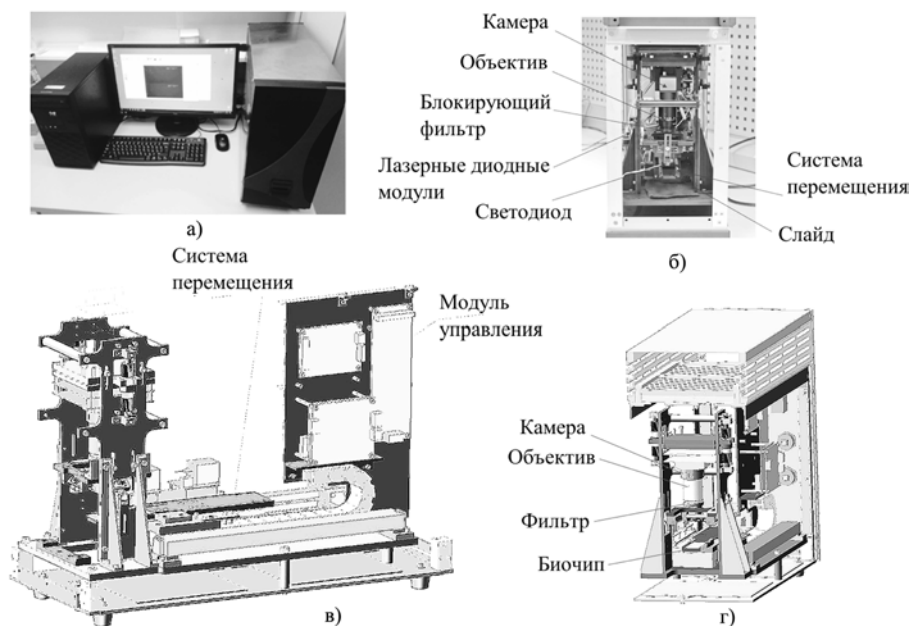


Рис. 1. Разработанный флуоресцентный анализатор: а) внешний вид макета флуоресцентного анализатора, подключенного к ПК; б) взаиморасположение основных компонентов аналитического блока флуоресцентного анализатора в раскрытом виде; в) аксонометрическая проекция, отражающая строение механической системы перемещения анализатора; г) аксонометрическая проекция, отражающая строение оптической системы оптико-механического блока анализатора

## Алгоритм выполнения полного цикла измерения флуоресценции биочипа

Биочип помещается в корпус анализатора при помощи столика, закрепленного на подвижке. Для определения зоны исследования включаются освещающие диоды белого света и проводится быстрое сканирование всей области биочипа. Далее задается необходимая область сканирования биочипа и устанавливаются параметры CMOS-камеры, необходимые для регистрации изображения, такие как время выдержки видеокамеры (чем больше время накопления, тем более слабые значения флуоресценции можно зарегистрировать) и аппаратное усиление видеокамеры (также позволяет регистрировать слабые сигналы флуоресценции, однако при высоких значениях, выставленных для усиления видеокамеры, добавляется шум, производимый самой видеокамерой).

Также с использованием программного обеспечения (ПО) включаются источники излучения, возбуждающие флуоресценцию, и регулируется их мощность. В процессе сканирования возбуждающее флуоресценцию излучение падает на исследуемую область биочипа, расположенную непосредственно под объективом фотоприемника в соответствии со схемой, представленной на рис. 2. Для полноразмерного сканирования всего биочипа последовательно регистрируется несколько отдельных кадров, из которых далее ПО формирует цельное изображение путем их сшивки.

Для полуавтоматической реализации различных вариантов сканирования биочипов были выделены четыре режима работы флуоресцентного анализатора (табл. 1).

Дополнительно в разработанном флуоресцентном анализаторе была реализована функция распознавания штрих-кода сканируемого биочипа. В частности, при наличии двухмерного кода на биочипе происходит автоматическое декодирование, в ходе которого выключается возбуждающее флуоресценцию излучение, включаются диоды подсветки, область с двухмерным кодом располагается в поле зрения видеокамеры и производится считывание занесенной туда информации.

Полученное изображение проходит дальнейшую обработку в ПО для анализа интегральной интенсивности излучения

флуоресценции спотов [7]. Вначале для всех режимов применяются «вычитание темнового тока» и нормировка на неоднородность освещения. Далее для проведения анализа на биочипе необходимо выделить зоны, в которых располагаются споты. Для этого создается прямоугольная сетка, обозначающая область анализа, которая «накладывается» на изображение исследуемого биочипа (участок определяется визуально по наличию спотов). В сетке указываются примерный диаметр спота, количество спотов в строке и столбце, их примерное расстояние друг от друга.

После проведения предварительного поиска выполняется точный поиск расположения спотов в созданных сетках одним из двух методов: поиск спотов с фиксированным (одинаковым для всех) размером диаметра или с адаптивным (подгоняемым под спот) размером диаметра [8]. После выделения зон со спотами и определения их расположения внутри сеток производится расчет интенсивности флуоресценции спотов по одному из методов: «среднее минус фон» или «медиана минус фон» [9], [10].

## Экспериментальная проверка разработанного анализатора

Следующим шагом анализа возможностей изготовленного флуоресцентного анализатора стало сравнение качества измерений с имеющимися аналогами сканеров «ScanArray Express» («PerkinElmer», США) и «InnoScan 710» («Innopsys», Франция). Эксперимент проводился на калибровочном слайде с флуорофорами  $Cu_3$  и  $Cu_5$ ; для обеспечения эквивалентных условий сравнения был выбран один «субэрей», который был проанализирован одним и тем же методом расчета интенсивности флуоресценции в ПО каждого из представленных приборов. Графики зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации флуорофора в спотах, полученные методом расчета интенсивности спота по среднему значению с вычитанием медианы фона для каждого из сравниваемых приборов при возбуждении флуоресценции  $Cu_3$  и  $Cu_5$ , представлены на рис. 3.

## Заключение

Изготовленный флуоресцентный анализатор базируется на системе регистрации, включающей в себя высокочувствитель-

Таблица 1

Режимы измерения биочипов с использованием разработанного анализатора

Название режима	Лазер, нм	Мощность лазера, %	Время выдержки, с	Количество усреднений	Время эксперимента при сканировании всего биочипа, с
Стандартный эксперимент	520	74	2,49763	1	65
	633	80		8	118
Максимальная светочувствительность	520	75	14,58153	2	240
	633	82			
Полный диапазон	520	74	2,00959	10	210
		80	7,99901	2	
	633	14,58153	1		
Сканирование с белым светом	Белый светодиод	100	0,35004	1	50



Рис. 2. Получение изображения с использованием разработанного анализатора: а) опико-механическая схема флуоресцентного анализатора; б) фрагмент изображения, полученный с его помощью

ную CMOS-видеокамеру высокого разрешения с длительным накоплением сигнала и низкими собственными шумами и 10 Мп-объектив с постоянным фокусным расстоянием. В качестве источников возбуждения флуоресценции используются полупроводниковые лазерные модули с волоконным выходом, обладающие относительно однородным полем распределения энергии.

Разработанный нами анализатор является универсальным и подходит для регистрации Су3/Су5-флуоресцентных сигналов на поверхности любой твердой подложки размерностью 25,4 × 76,2 × 1 мм. Анализатор удовлетворяет всем параметрам, необходимым для проведения анализа с использованием биочипов низкой плотности, например для белковых биочипов, в которых реализован «сэндвич»-формат ИФА. В частности, благодаря использованию анализатора удается получить стабильное качественное изображение, а разработанное к нему программное обеспечение позволяет провести квантификацию регистрируемого флуоресцентного сигнала. В настоящий момент разработанный анализатор проходит тестирование с использованием биочипов для диагностики гриппоподобных заболеваний и тяжелых острых респираторных инфекций, а также биочипов для определения уровней белковых маркеров воспаления.

**Проект осуществлен при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2019-1241 от 10.06.2019 г. (ранее № 14.604.21.0180 от 26.09.2017 г.), уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI60417X0180.**

*Список литературы:*

1. Cortese J.D. Microarray readers: Pushing the envelope: Companies adopt many strategies to overcome technical challenges // The Scientist. 2001. Vol. 15. № 24. PP. 36-40.
2. Wang X. et al. Optical systems for microarray scanning / Патент № 7706419. США, 2010.
3. Wang M., Feng W., Kain R. Biological microarray line scanning method and system / Патент № 7791013. США, 2010.
4. Жихарев А.А., Шамаева Г.Г. Электронно-лучевые и фотоэлектронные приборы. – М.: Изд-во «Высшая школа», 1982.
5. Носов Ю.Р., Шилин В.А. Основы физики приборов с зарядовой связью. – М.: Издательство «Наука», 1986.
6. Hamilton G. et al. A large field CCD system for quantitative imaging of microarrays // Nucleic acids research. 2006. Vol. 34. № 8. PP. e58-e58.
7. Fraser K., Wang Z., Liu X. Microarray image analysis: An algorithmic approach. Chapman and Hall. – London: CRC Press, 2010.
8. Розенберг Г.С. и др. Экологическое прогнозирование (функциональные предикторы временных рядов). – Тольятти: Изд-во «Институт экологии Волжского бассейна РАН», 1994.
9. Грешилов А.А., Стакун В.А., Стакун А.А. Математические методы построения прогнозов. – М.: Изд-во «Радио и связь», 1997.

10. Шмойлова Р.А., Минашкин В.Г., Садовникова Н.А. Практикум по теории статистики. – М.: Изд-во «Финансы и статистика», 2011.

Сергей Анатольевич Клотченко,  
канд. биол. наук, зав. лабораторией разработки  
молекулярных диагностических систем,  
отдел молекулярной биологии вирусов,  
ФГБУ «Научно-исследовательский институт  
группа им. А.А. Смородиной» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
Жан-Мишель Байанга,  
инженер,  
АО «Научные приборы»,  
Марина Александровна Плотникова,  
канд. биол. наук, ст. научный сотрудник,  
лаборатория системной вирусологии,  
отдел молекулярной биологии вирусов,  
ФГБУ «Научно-исследовательский институт  
группа им. А.А. Смородиной» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
Артем Андреевич Сакацев,  
начальник сектора систем лазерной обработки материалов,  
АО «Научные приборы»,  
Андрей Владимирович Васин,  
д-р биол. наук, исполняющий обязанности директора,  
Институт биомедицинских систем и биотехнологий,  
доцент,  
Санкт-Петербургский политехнический  
университет Петра Великого,  
зав. отделом молекулярной биологии вирусов,  
ФГБУ «Научно-исследовательский институт  
группа им. А.А. Смородиной» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
исполняющий обязанности директора,  
Научно-образовательный центр биофизических  
исследований в сфере фармацевтики,  
доцент,  
Санкт-Петербургский государственный  
химико-фармацевтический университет,  
Владимир Абович Готлиб,  
канд. физ.-мат. наук, руководитель  
лазерно-оптического направления,  
гл. конструктор,  
Владимир Александрович Елохин,  
канд. физ.-мат. наук, генеральный директор,  
АО «Научные приборы»,  
г. С.-Петербург,  
e-mail: fosfatik@mail.ru

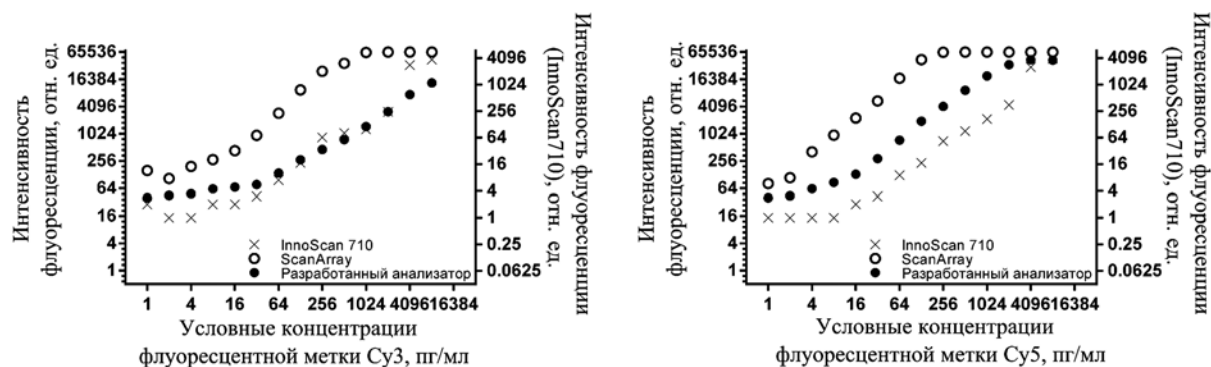


Рис. 3. Сравнение результатов вычисления интенсивности флуоресценции спотов на каналах Су3 и Су5, полученных для калибровочного слайда при его сканировании на разработанном анализаторе (черные точки), «ScanArray» (белые кружки) и «InnoScan 710» (крестики)