

УДК 543.545: 535.371/ 372

© Б. Г. Беленький, Р. А. Козулин, В. Е. Курочкин

## ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ЖИДКОСТИ. АНАЛИЗ ПРОБЫ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ НЕ БОЛЕЕ $1 \times 10^{-15}$ М. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ОДНОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ЛИФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Рассматриваются методы и критерии одномолекулярного детектирования в жидкости. Особое внимание уделяется детектированию индивидуальных молекул в капиллярном электрофорезе методом лазер-индуцированной флуоресценции, где рассматриваются основные экспериментальные трудности на этом пути.

### ВВЕДЕНИЕ

Важнейшая проблема современной аналитической химии — фракционирование, детектирование и идентификация индивидуальных молекул. Одномолекулярное детектирование обеспечивает прорыв в следовом и биомедицинском анализе, экологическом мониторинге, аналитической биотехнологии. Эта новация позволяет принципиально усовершенствовать диагностику бактерий и вирусов, флуоресцентный иммуноанализ; создать новые высокочувствительные технологии анализа ДНК для идентификации начинающих злокачественных опухолей, следов вирусных и бактериальных загрязнений с минимальным количеством целевых нуклеиновых кислот; создать технологии количественного определения малораспространенных видов мРНК без потери времени и помех, вызываемых амплификацией. Последнее окажется полезным и для усовершенствования стандартного анализа ДНК путем уменьшения циклов амплификации. Эти методы позволят принципиально усовершенствовать технику химического и биохимического ультрамикрораспределения, изучения физических, химических свойств и взаимодействий индивидуальных молекул на дискретном (цифровом) уровне, обеспечивая возможность получения уникальной информации при резком снижении необходимой массы пробы.

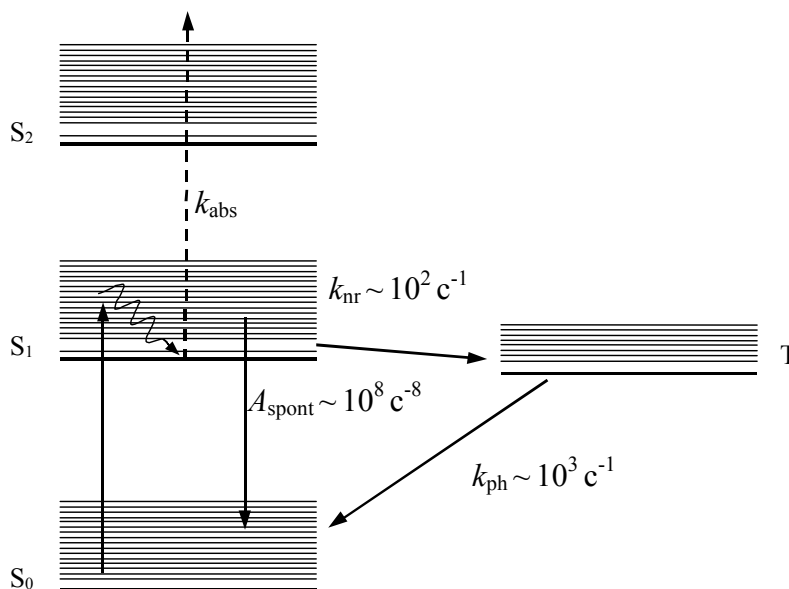
Некоторые из этих задач уже решаются с помощью хорошо известного высокочувствительного ЛИФ-детектирования ( $10^{-21}$ – $10^{-20}$  моль). Однако предельная цель в этом направлении — возможность детектирования индивидуальных молекул [1]. В последние несколько лет для изучения индивидуальных молекул получила развитие флуоресцентная криогенная техника в твердых телах с использованием узкополосных лазеров на

красителях [2–4]. Недавно несколько групп сообщили об исследовании при комнатной температуре ориентации диполей индивидуальных молекул и их поверхностной динамики с помощью микроскопии ближнего поля [5–7]. Особый интерес для аналитической и биоаналитической химии представляет детектирование индивидуальных молекул в жидкой фазе. Пионерами в этой области с использованием техники "временного окна" являются Keller [8–10] и Mathies [11, 12]. Недавние усовершенствования техники Keller'a включают возбуждение в ближней ИК-области [13] и детектирование с помощью лавинного фотодиода [14]. Используя корреляционный метод, исследователи продемонстрировали детектирование индивидуальных молекул в очень малом (фемтолитровом) объеме капелек раствора перед объективом конфокального микроскопа [15]. Конфокальная флуоресцентная микроскопия была непосредственно применена для детектирования флуоресценции индивидуальных молекул [16]. Флуоресцентные красители и меченная флуоресцентными красителями ДНК детектировались в ограниченных каплях [16], левитирующих микрокапельках [17], фокусирующих футлярных потоках [8, 9], потоках в капилляре [10, 11, 18]. Биологические макромолекулы наблюдались как индивидуальные молекулы методом флуоресцентной микроскопии [19]. Эта техника была использована для изучения конформационной динамики макромолекул [20–22], исследования свойств ДНК [23], поведения РНК-полимеразы [24]. В то время как многие из этих методов хорошо известны, до последнего времени отсутствовали работы по хроматографической и электрофоретической сепарации индивидуальных молекул. Лишь в самое последнее время появились работы по капиллярному электрофорезу индивидуальных молекул [18, 25–27].

## ОГРАНИЧЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Некоторые факторы ограничивают чувствительность флуоресцентного детектирования индивидуальных молекул и тем самым долю детектируемых молекул в пробе. Процесс флуоресценции начинается с абсорбции фотона, который переводит молекулу из основного состояния  $S_0$  в первое возбужденное синглетное состояние  $S_1$  (рис. 1). Константа скорости абсорбции  $k_{abs}$  — это произведение поперечного сечения абсорбции  $\sigma$  ( $\text{см}^2$ ) и потока фотонов, падающих на молекулу,  $F$  ( $\text{см}^{-2} \text{с}^{-1}$ ). Обычно скорость абсорбции ограничивается только интенсивностью светового потока лазера. После диссипации небольшой части абсорбированной энергии в быстром ( $<10^{-14}$  с) нерадикационном релаксационном переходе происходит эмиссия фотонов флуоресценции, которая занимает  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  с у большинства ионных красителей. После этого молекула возвращается в основное электронное состояние и готова для нового абсорбционно-эмиссионного цикла. При насыщении интенсивности возбуждения время абсорбционно-эмиссионного цикла ограничивается временем жизни флуоресценции, так что при высоком квантовом выходе могут эмитироваться миллионы фотонов флуоресценции в секунду. Преимущество ионных красителей для флуоресцентного детектирования индивидуальных молекул заключается в высоком ( $\approx 1$ ) квантовом выходе. Хотя при некото-

рых комбинациях красителей и растворителей синглет—триплетная перекрестная скорость  $k_{nr}$  (в направлении  $T_1$ ) может стать значительной, серьезно уменьшая скорость счета флуоресценции. Сечение абсорбции для большинства красителей ( $\sim 10^{-16} \text{см}^2$ ), что на много порядков больше, чем у неэластических процессов типа релеевского рассеяния. Временные и спектральные свойства флуоресценции красителей также определяют возможность и уровень детектирования индивидуальных молекул. Флуоресцентная эмиссия имеет типичное красное смещение по отношению к частоте возбуждения и является значительно более медленным процессом (занимая микро- и наносекунды), чем релеевское и рамановское рассеяния (фемтосекундная область). Эти свойства облегчают разделение сигнала и фона как во временной, так и в частотной области. Имеются некоторые ограничения в величине сигнала, который может быть получен от индивидуальной молекулы. Скорость счета флуоресценции, определяемая временем абсорбционно-эмиссионного цикла, ограничена временем жизни флуоресценции ( $1/A_{spont}$ ). Кроме того, конечное фотохимическое время жизни красителей ограничивает число абсорбционно-эмиссионных циклов до деструкции или обесцвечивания молекул. Фотообесцвечивание конкурирует со спонтанной эмиссией, так что общее число фотонов, эмитированных при флуоресценции, пропорционально скорости



**Рис. 1.** Схема энергетических уровней сольватированного ионного красителя. Стрелка с характеристикой  $k_{abs}$  — возбужденная стадия абсорбции; стрелки с характеристикой  $A_{spont}$  — спонтанная радиация, с  $k_{nr}$  — внутрисистемный переход [1], с  $k_{ph}$  — фосфоресценция

спонтанной эмиссии, деленной на скорость фотообесцвечивания [28]. Таким образом, даже в эксперименте, где время взаимодействия лазера с аналитом по существу бесконечно, происходит конечное число актов флуоресценции. Фотохимическое время жизни может быть определено как произведение скорости возбуждения  $k_{abs}$  и квантового выхода фотообесцвечивания  $\Phi$ , которое соответствует вероятности фотообесцвечивания в цикле абсорбции (возбуждения)—эмиссии. Квантовый выход фотообесцвечивания — это функция красителя и растворителя [29] с типичным значением от  $\approx 10^{-5}$  до  $10^{-7}$ . Среднее число циклов абсорбции—эмиссии до фотообесцвечивания составляет  $1/\Phi$  или около  $10^6$ . На пределе насыщения ( $k_{abs} \approx 10^8 \text{ с}^{-1}$ ) фотохимическое время жизни порядка 10 мс.

Существенно, однако, что для эффективности детектирования важен не сигнал, а отношение сигнала к шуму  $S/N$  и величина фона. Как источник шума (рамановское, релеевское рассеяния растворителя, флуоресценция примесей в растворителе) во всех типах экспериментов доминирует фон. Флуоресценцию примесей в растворителе можно элиминировать, подвергая их глубокой очистке, но это не тривиальная проблема из-за фотодеградаци и адсорбции примесей на стенках. Реальный вклад релеевского и рамановского рассеяний может быть значительным из-за некачественных широкополосных фильтров, зачастую используемых в экспериментах по детектированию индивидуальных молекул. Поскольку величина фона растет с увеличением объема пробы, критичным является уменьшение ее объема (до 10 пл). Поскольку в экспериментах по сверхчувствительному детектированию используется счет фотонов, необходимо добиваться максимальной эффективности их детектирования. Вследствие изотропии эмиссии флуоресценции в пространстве только 10–20 % флуоресценции собирается оптикой. Комбинация тонких фильтров с пропусканием  $\leq 50\%$  и детектора с квантовым выходом 10–50 % делает эффективность детектирования фотонов от 0.5 до 5 %. Невысокая эффективность детектирования фотонов и ограничение сигнала индивидуальной молекулы в результате фотообесцвечивания ограничивают минимальную пробу несколькими тысячами детектируемых

### КРИТЕРИИ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Детектирование индивидуальной молекулы обычно ограничивается пороговым критерием, подобно дискриминационным схемам, которые дают логический импульс, когда амплитуда вхо-

дящего сигнала превосходит некоторый пороговый уровень. В типичных экспериментах пороговый уровень (LOD, limit of detection) составляет  $\approx 3 (S/N=3)$  стандартных отклонений фона  $\sigma_b$ . При фоновом сигнале, который подчиняется распределению Пуассона (ограничивающему дробовой шум), детектирование происходит, когда сигнал молекулы превышает утроенный квадратный корень среднего фонового сигнала. Относительно небольшое число фотонов флуоресценции, эмитируемых молекулой в жидкости, мешает использованию таких тестов, как антигрупповые (antibunching) фотоны в криогенном твердом теле [30]. Окружение сильно влияет на эффективность детектирования и его концентрационный предел. Выбор высокого порогового значения (LOG, limit of guarantee) — 6 стандартных отклонений фона  $\sigma_b$  — гарантирует исчезающе малую вероятность ложного детектирования. Однако при этом большая часть молекул не будет детектироваться, поскольку сигнал не превзойдет порог. Наоборот, уменьшение порогового значения увеличивает число детектируемых молекул, хотя растет и вероятность ошибки. Таким образом, эффективность молекулярного детектирования определяется амплитудой распределения вероятностей фона и сигнала, а также степенью их перекрывания.

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОДНОМОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Перекрытие сигнального и фонового распределений счета фотонов определяет достоверность одномолекулярного детектирования (рис. 2). Счет

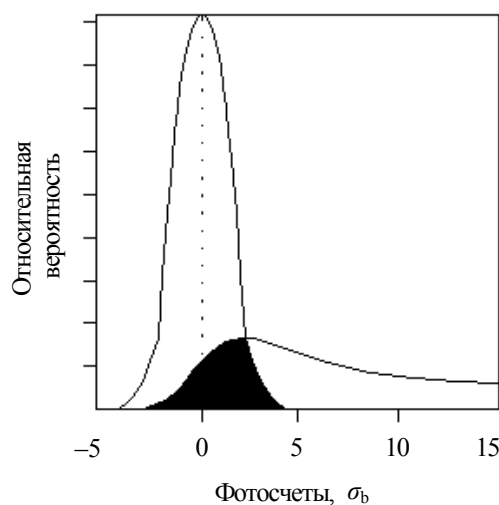
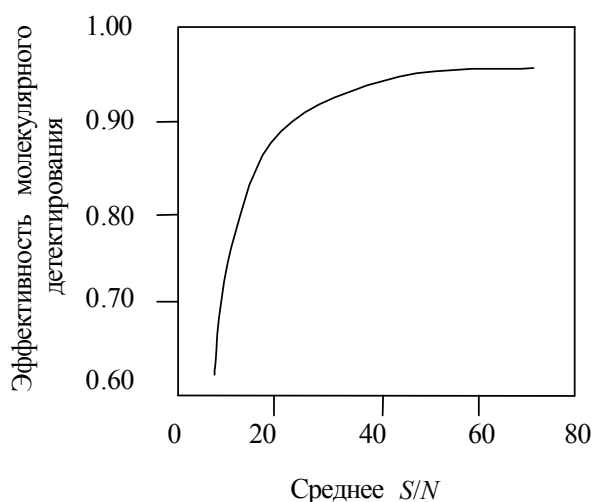


Рис. 2. Распределение вероятностей флуоресценции и фонового шума для R6G. Справа и слева от предела (+) и (–) ошибки [1]



**Рис. 3.** Эффективность молекулярного детектирования для однохромоморфной молекулы как функция среднего  $S/N$  [1]

фотонов характеризуется средним числом счета сигналов  $\langle s \rangle$  и шума  $\sigma_b$ . Эффективность одномолекулярного детектирования определяется средним  $S/N$  или  $\langle s \rangle / \sigma_b$ . Рис. 3 показывает зависимость вероятности одномолекулярного детектирования от среднего  $S/N$  для однохромоморфной молекулы родамина 6G (R6G). Порог для каждого значения  $\langle s \rangle / \sigma_b$  выбирается так, чтобы минимизировать полную ошибку в достоверности (ложную + и ложную –). Поскольку распределение достоверности счета фотонов для однохромоморфной молекулы экспоненциальное, перекрытие распределения фона медленно уменьшается с увеличением  $S/N$ . Эффективность одномолекулярного детектирования имеет асимптотический предел. Даже при среднем  $S/N \approx 50$  эффективность молекулярного детектирования достигает только 95 %. Среднее  $S/N$ , следовательно, ограничивает сверху ошибку достоверности. Другие факторы, такие как негомогенность интенсивности лазера или молекулярная диффузия, влияют на эффективность одномолекулярного детектирования значительно меньше, чем  $S/N$ . На достоверность одномолекулярного детектирования влияет форма распределения сигнального счета фотонов. Статистика счета фотонов флуоресценции индивидуальных молекул сильно зависит от числа независимых хромофоров [31]. Например,  $\beta$ -phycocerythrin — большая молекула с 34 независимыми хромофорами, имеет достоверность детектирования, приближающуюся к 1 для умеренно среднего  $S/N = 10$ , в то время как при том же среднем  $S/N$ , достовер-

ность детектирования однохромоморфного R6G только 0.77. Распределение счета сигнальных фотонов зависит от доли молекул, претерпевающих фотообесцвечивание [32]. Когда время взаимодействия излучения лазера с веществом анализата много меньше фотохимического времени жизни, только часть молекул подвергается фотообесцвечиванию. Однако неполное фотообесцвечивание преимущественно влияет на часть распределения, которая не перекрывается с фоном и, следовательно, в незначительной степени определяет достоверность одномолекулярного детектирования.

Эффективность одномолекулярного детектирования зависит как от статистики счета фотонов, так и способности точно определить число молекул в данном объеме пробы. Как показано в работе [33], распределение сигнальных всплесков от числа молекул  $\beta$ -phycocerythrin'a показывает хорошо заметные пики, соответствующие одной, двум и трем молекулам. В случае однохромоморфных молекул подобие между распределениями счета фотонов мешает четкому определению числа молекул с разной амплитудой всплесков флуоресценции. Однако, если время взаимодействия лазера с анализатом достаточно для измерения кинетики фотообесцвечивания, можно различить одну или более молекул на основе временной зависимости скорости счета флуоресценции [34]. Поскольку время взаимодействия лазера с анализатом много меньше среднего времени фотообесцвечивания, флуоресцентный сигнал ограничен только временем движения молекулы в детектируемом объеме. В этом случае могут быть измерены амплитуды всплесков, которые мало различаются у одной и двух однохромоморфных молекул. Доля общего числа сигнальных всплесков, ожидаемая от двух молекул, есть пуассоновская вероятность наличия двух молекул в объеме детектирования, деленная на вероятность наличия одной молекулы в объеме детектирования. Доля двухмолекулярных всплесков может быть значительной, даже если вероятность присутствия двух молекул в детектируемом объеме очень мала. Нечеткость таких параметров, как негомогенность интенсивности возбуждения, молекулярная диффузия, могут при детектировании затемнять различия между одной и двумя молекулами.

### МЕТОДЫ ОДНОМОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В ЖИДКОСТИ

Экспериментальные методы, развиваемые для одномолекулярного детектирования в жидкости, обладают некоторыми общими характеристиками. Все они для минимизации шума рассеянного света используют малый объем жидкости для освещения и (или) сбора флуоресценции, применяют высоко-

апертурные объективы для увеличения сбора света, используют сильную пространственную и оптическую фильтрации для уменьшения фонового сигнала. Для одномолекулярного детектирования в жидкости применяются следующие методы.

### Детектирование через временные окна (time-gated detection)

Эта техника, развитая Keller'ом [9], основана на различиях временных шкал флуоресценции и рамановского и релеевского рассеяний на несколько порядков величин. Продолжительность флуоресценции в видимой области спектра обычно составляет несколько наносекунд, в то время как рамановское и релеевское рассеяния света по существу происходят мгновенно. Таким образом, флуоресценция, рамановское и релеевское рассеяния разделены по времени и по частотам. Распределения во времени рамановского и релеевского рассеяний представляют функцию детектора (гауссоподобную функцию с шириной на полувысоте 500–750 пс), а временной профиль флуоресценции экспоненциальный (с типичной временной константой  $\tau \approx 3.5$  нс), свернутый с приборной функцией. Таким образом, выбирая подходящее окно считывания, число фоновых счетов может быть уменьшено за счет нечувствительности фотокатода вне определенного окна. В этой технике используется время-коррелированный счет фотонов. Аналоговый импульс напряжения с амплитудой, пропорциональной времени прихода, генерируется для каждого выхода с фотокатода. Используется дискриминация по высоте импульса для того, чтобы засчитать или отвергнуть импульс, уменьшая таким образом фоновый сигнал. Главное преимущество этой техники — высокая скорость и пропускная способность. Используя простую проточную ячейку или проточный цитофлуориметр, можно детектировать единичные молекулы с временем лазер-аналитного взаимодействия порядка нескольких мс и амплитудами вспышек фотонов порядка 10–20 счетов.

Этот метод, однако, имеет некоторые недостатки. В простой проточной ячейке без гидродинамического фокусирования только  $\approx 0.01$  % молекул аналита действительно опрашивается в объеме пробы [13]. Вносит значительные ограничения мертвое время детектора, которое влияет на скорость счета флуоресценции, поскольку в экспериментах используются время-амплитудные конвертеры (ТАС) с конечным временем процессинга. Типичное время ТАС  $\approx 5$  мкс, которое ограничивает скорость счета  $< 100$  кГц.

Некоторые из этих проблем решаются [14] путем помещения микрокапилляра (0.3 мкм) в ювенту с футлярным потоком, в верхней части которого фокусируется лазерный луч. Эта конфигурация

значительно уменьшает диффузионные потери на sulforhodamine 101, эффективность молекулярного детектирования которого достигала  $\approx 80$  %, т.е. укладывалась в теоретический предел, основанный на среднем  $S/N \approx 10$ . Отношение  $S/N$  улучшается при использовании окна субнаносекундных антисовпадений как временного предфильтра на фронте ТАС для уменьшения времени истощения процессинга фонового выхода.

### Флуоресцентная корреляционная спектроскопия и конфокальная микроскопия

Техника конфокальной флуоресцентной микроскопии [14] хорошо подходит для одномолекулярного детектирования. В этом методе высокоапертурный объектив (типично  $>1$ ) используется как для фокусирования лазерного луча, так и сбора флуоресценции. Это позволяет очень эффективно собирать флуоресценцию и использовать исключительно малый освещенный объем (1 фл), освобождающий от фона и позволяющий получать интенсивный сигнал при мощности лазера  $< 1$  мВт. Во флуоресцентной корреляционной спектроскопии [35, 36] конфокальная микроскопия позволяет измерять средние флуктуации сигнала флуоресценции, используя цифровой автокорреляционный анализ время-разрешенного сигнала флуоресценции [35]. Преимущества этого приближения в том, что автокорреляционная функция несет информацию о коэффициентах диффузии, связанных с размерами аналита. R.N. Zare [16] недавно показал, что одномолекулярное детектирование может выполняться путем непосредственного использования конфокальной флуоресцентной микроскопии без автокорреляционного анализа. При этом для R6G и флуоресцеина получены: отношение  $S/N \approx 10$  и дробовой шум  $\approx 6$  счетов при интегрировании за 1 мс. При анализе ультраразбавленных растворов, наибольшее ограничение конфокальной флуоресцентной микроскопии заключается в исключительно малом объеме наблюдения. В типичных условиях эксперимента, когда каплю раствора помещают на предметное стекло микроскопа, число фотонов, вспыхивающих в единицу времени контролируется диффузией аналита в освещенную область. Если молекула не претерпевает фотообесцвечивания, она может через некоторое время вернуться в лазерный луч, продуцируя таким образом более чем одну фотонную вспышку. В результате число вспышек фотонов может превосходить число опрашиваемых молекул. К сожалению, из-за малых размеров детектируемого объема, конфокальная микроскопия не подходит для проточных систем, таких как капиллярный электрофорез, где размер капилляра больше 10 мкм, и, таким образом, большая часть молекул не детектируется.

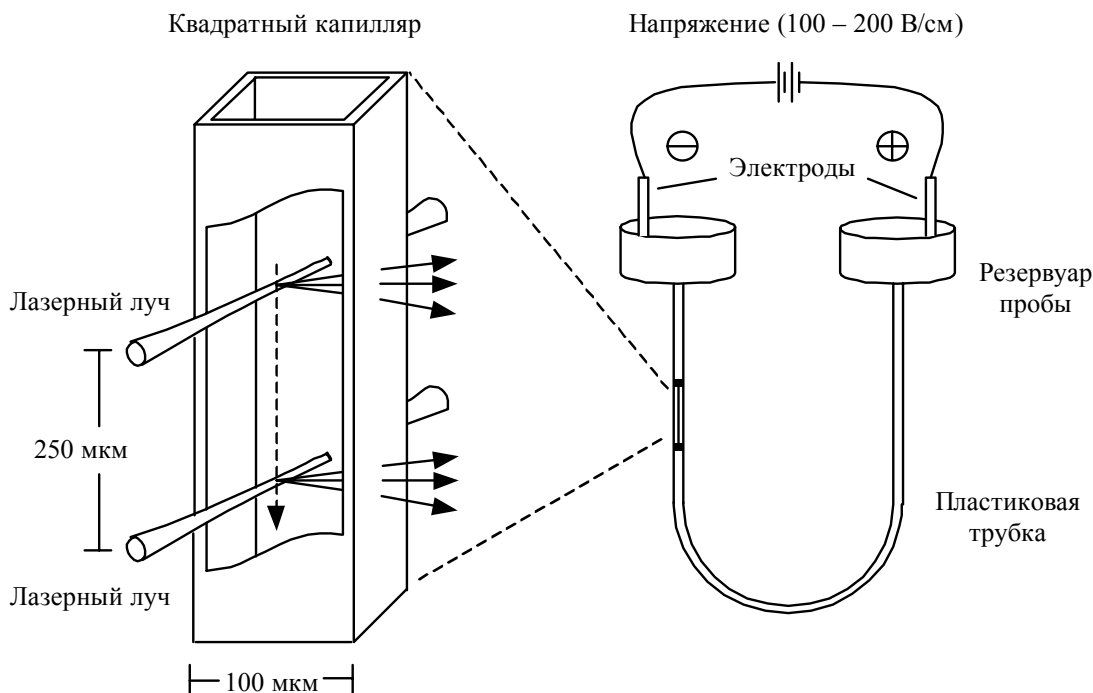
### Микрокапли

Микрокапельное приближение к одномолекулярному детектированию в жидкости уникально в нескольких отношениях. Во-первых, объем в 1 пл определяется размером капли, а не размером лазерного луча. В результате молекулы аналита ограничены объемом капли без диффузионных потерь, и эффективность молекулярного детектирования определяется только средним  $S/N$ . Во-вторых, левитация капелек в электродинамической ловушке [38] может сделать время лазер-аналитного взаимодействия много большим, чем среднее время фотообесцвечивания, ограничивающее в обычных случаях максимально возможный сигнал. В-третьих, свойства излучения, такие как частота и время участия атомов и молекул, могут быть значительно модифицированы за счет квантового электродинамического эффекта полости (cavity quantum electrodynamic effect) [39–41]. Например, спонтанная скорость эмиссии и интегрированный выход флуоресценции R6G увеличиваются в 4 мкм каплях глицерина [14]. Таким образом, микрокапельное приближение дает значительные преимущества в уровне одномолекулярного сигнала. В работе [34] индивидуальная молекула R6G была детектирована в левитирующих микрокаплях глицерина с  $S/N$ -отношением 10–40 и интегрированным флуоресцентным сигналом в диапазоне от  $\approx 150$  до 2200 фотонов, при использовании непрерывного лазера и фотоумножителя. При этом распределение сигналов хорошо соответствовало теоретическим предсказаниям. Большая часть чувствительности, связанной с техникой левитации, получается за счет уменьшения скорости. При этом время, необходимое для левитации, измерения флуоресценции и измерения размеров требует нескольких минут, делая это приближение несостоятельным в применении к высокопроизводительному анализу. Практически анализ ультра-разбавленных растворов с использованием цифровой техники молекулярного детектирования [33] требует  $\approx 10^4$ – $10^6$  измерений. Следовательно, необходима высокоскоростная версия микрокапельной флуориметрии. Чтобы улучшить производительность микрокапельной флуориметрии, были разработаны приборы для одномолекулярного детектирования в потоке свободно падающих капель. Капли двигались в протяженной полости мощного аргонового лазера, оканчивающейся острием генератора капель, со скоростью  $\approx 1$  м/с. Поскольку при большой скорости широкий луч лазера максимизирует время лазер-аналитного взаимодействия, требуется необычайно высокая мощность лазера. Чтобы насытить  $S_0 \rightarrow S_1$  переход для R6G, по расчетам необходима средняя мощность  $\approx 20$  кВт при ширине луча  $\approx 1.5$  мм (использовался лазер мощностью около 10 кВт). Преиму-

щество высокоинтенсивного возбуждения в том, что скорость счета флуоресценции ограничена только временем жизни флуоресценции аналита. Распределение интенсивности при генерации капель стоячей волной намного информативнее, чем распределение внутренней интенсивности, связанной с возбуждением бегущей волной. В этой конфигурации лимит детектирования R6G составлял  $\approx 10$  молекул, а скорость одномолекулярного детектирования достигала 5–10 кГц.

### Лазер-индуцированное флуоресцентное детектирование индивидуальной молекулы в капилляре. Высокоэффективный капиллярный электрофорез с одномолекулярным ЛИФ-детектированием

Сочетание капиллярного электрофореза с одномолекулярным ЛИФ-детектированием открывает выдающиеся возможности для аналитических и биоаналитических исследований. В отличие от хроматографии, которая характеризуется значительным размытием, благодаря которому время выхода одной молекулы достаточно неопределенно, капиллярный электрофорез (у которого размытие зон при правильной постановке эксперимента исключительно мало) позволяет получить точные результаты по времени миграции, а следовательно, электрофоретической подвижности, даже для единичных молекул. Таким образом, ультравысокочувствительный капиллярный электрофорез, позволяющий получать уникальную информацию по электрофоретическому поведению индивидуальных молекул, в достоверности результатов не уступает классическим высокоэффективным микро-сепарационным методам с ЛИФ-детектированием: высокоэффективному капиллярному электрофорезу, а тем более капиллярной хроматографии, где одновременно анализируется  $\geq 10^3$  молекул и этим достигается статистически достоверный результат. Однако на пути реализации капиллярного электрофореза с одномолекулярным детектированием стоят серьезные трудности, которые в области детектирования индивидуальных молекул удалось преодолеть Y.-H. Lee, R.G. Maus, V.W. Smith, and J.D. Winefordner [18]. Последние два года публикуются работы по использованию этого метода для анализа индивидуальных молекул [18, 25–27]. Здесь внимание было направлено на детектирование в предельно малом (пл) объеме капилляра и статистическую обработку сигнала для надежного выделения всплеск флуоресценции индивидуальной молекулы. Поэтому исключались характерные для капиллярных методов экстраколочные системы детектирования, как например футлярная проточная ячейка. Использовались оригинальные разработки, такие как определение электрофоретической



**Рис. 4.** Установка для капиллярного электрофореза единичных молекул с ЛИФ-детектированием. Увеличенный рисунок слева — квадратная капиллярная ячейка  $10 \times 10$  мкм с двумя параллельными сфокусированными лазерными лучами [25]

подвижности путем измерения времени прохождения флуоресцирующей молекулы между двумя параллельными лучами лазера в прямоугольном капилляре размером  $10 \times 10$  мкм (рис. 4) [25]. Отсюда один шаг до использования одномолекулярного детектирования в микроаналитических системах (чип-анализаторах) [26]. К сожалению, в этих работах недооценивались такие моменты, как полнота участия всех молекул в абсорбционно-флуоресцентных циклах детектирования, необходимость 100 % удаления рассеянного света лазера и полного освобождения от фоновой флуоресценции. Поэтому авторам удавалось детектировать аналит, компоненты которого содержали не менее нескольких тысяч молекул. Лишь в работе [18], посвященной развитию новой ЛИФ-спектроскопической техники для детектирования движущихся через капилляр единичных молекул, показана возможность детектирования в капилляре действительно индивидуальных молекул. Этот результат получен путем глубокой оптимизации метода. Для возбуждения ЛИФ использовался лазер в ближней инфракрасной области спектра, излучение которого практически не абсорбировалось оптическими компонентами детектора (материалами измерительной ячейки, растворителем, примесями) и, следовательно, не возбуждалась соответствующая

фоновая флуоресценция. Сверхплотный светофильтр обеспечивал практически полное поглощение рассеянного лазерного излучения при полной прозрачности для света флуоресценции. Наиболее эффективным для этих целей является реализованный в работе [18] фильтр паров металла (MVF, metal vapor filter), представляющий нагреваемую кварцевую ячейку, заполненную инертным газом с парами летучего металла, обладающими резонансным поглощением на длине волны лазера. Для возбуждения флуоресценции использовался титан-сапфировый лазер, луч которого фокусировался в непокрытой части капилляра. Использование светофильтра RbMVF с парами рубидия, обладающего сверхвысокой оптической плотностью ( $\approx 8$  е.о.п.), позволяло, при настройке лазера на переходную линию Rb при  $\lambda = 780.023$  нм, полностью поглотить его рассеянный лазерный свет. Для детектирования использовался лавинный фотодиод с высокой эффективностью детектирования фотонов и низкой уровнем темнового тока. Сигнал подвергался статистической обработке для достоверного детектирования всплеск фотонов проходящих через лазерный луч молекул. С этой целью использовался среднеквадратичный суммирующий фильтр. Исследования, описанные в работе [18], вплотную приблизились к созданию капиллярного

Табл. 1. Повышение чувствительности ВЭКЭ путем концентрирования пробы

Метод	Отличительные особенности
Стекинг *	Сжатие пробы в буферном растворе с низшей, чем у рабочего буфера, электропроводностью или в условиях РН-градиента в капилляре. Повышение концентрации аналита до 8 раз
Усиление поля *	Концентрирование пробы в инъекционном конце капилляра путем переключения полярности после заполнения капилляра большим объемом пробы ("обратный стекинг")
Изотахорез	Согласованное (с одной скоростью) движение зон чистых (разделившихся) компонентов в самоорганизующемся ступенчатом градиенте поля. Концентрирование зон в степени, обратно пропорциональной электрофоретической подвижности компонентов. Концентрирование в $\approx 100$ раз
Хроматографическое концентрирование	Дорогостоящая реализация

**Примечание:** \* отмечены наиболее перспективные для одномолекулярного анализа методы

электрофореза с одномолекулярным ЛИФ-детектированием. Следует помнить, что высокоэффективный капиллярный электрофорез (ВЭКЭ) обладает большими собственными возможностями увеличения чувствительности анализа [43], как это показано в табл. 1, где наиболее перспективные для одномолекулярного анализа методы повышения чувствительности ВЭКЭ отмечены \*.

Поскольку работа [18] представляет принципиальное развитие одномолекулярного ЛИФ-детектирования в капилляре, расскажем о ней подробнее.

### ЛИФ-детектирование индивидуальных молекул в капилляре [18]

Для индуцирования флуоресценции использовался одномодовый перестраиваемый титан-сапфировый непрерывный лазер в кольцевой конфигурации, а для его накачки — аргоновый лазер (рис. 5). Луч титан-сапфирового лазера последовательно пропускаться через узкополосный интерференционный светофильтр  $\lambda = 780.1$  нм с шириной полосы 0.18 нм и 20х-расширитель, после чего фокусировался линзой (1:1.4;  $f = 55$  мм) на

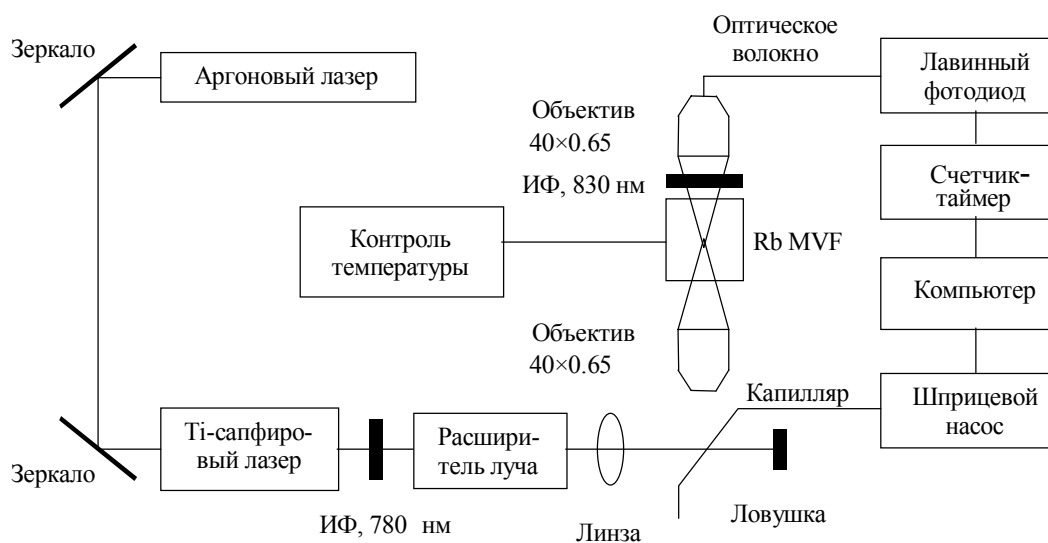


Рис. 5. Установка для одномолекулярного детектирования в капилляре [18]. ИФ — интерференционный фильтр, Rb MVF — фильтр с парами металла Rb



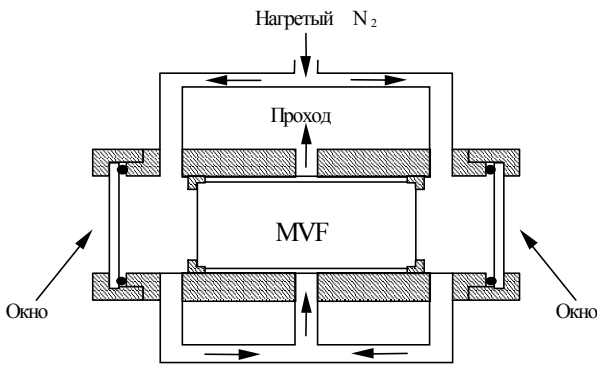


Рис. 6. Схема светофильтра с парами металла — RbMVF [18]

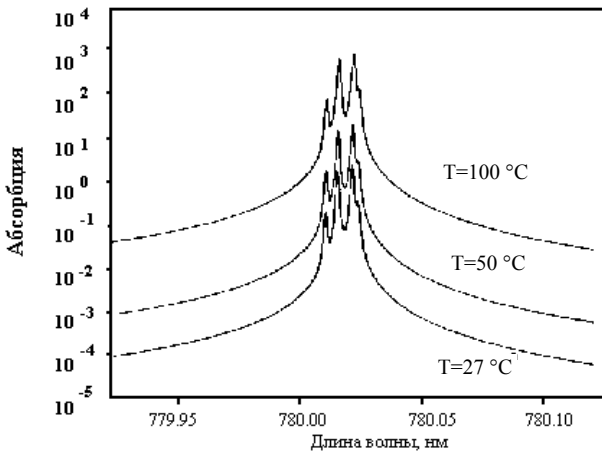


Рис. 7. Расчитанный абсорбционный профиль линии Rb  $\lambda = 780.023$  нм при разных температурах. Длина оптического пути 10 см, давление азота 200 торр при 25 °C [18]

непокрытую часть заполненного пробой капилляра ( $\varnothing_{\text{вн.}} = 11$  мкм,  $\varnothing_{\text{н.}} = 139$  мкм, длина 10 см), образуя световое пятно размером  $\varnothing = 11$  мкм. Освещенная область капилляра ( $l = 11$  мкм,  $d_c = 11$  мкм) имела объем  $V_d = 1.05$  пл. Флуоресценция (и рассеянный свет лазера) собирались объективом  $40 \times 0.65$  в светофильтр MVF (рис. 6). Поскольку полное удаление рассеянного света лазера — главное условие одномолекулярного ЛИФ-детектирования, светофильтр MVF с парами рубидия Rb является наиболее критическим компонентом оптической системы для одномолекулярного ЛИФ-

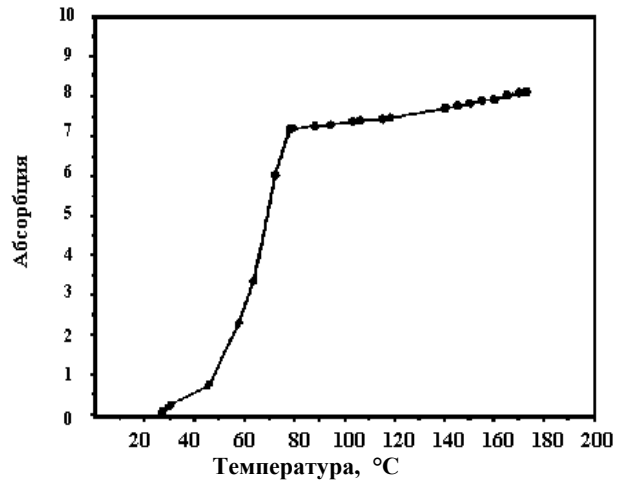


Рис. 8. Экспериментальные данные по абсорбции парами Rb на длине волны  $\lambda = 780.023$  нм как функции температуры. Длина оптического пути 10 см, давление азота 200 торр при 25 °C [18]

детектирования. MVF — это узкополосный оптический фильтр, сверхплотный на волне излучения лазера, который полностью задерживает рассеянное лазерное излучение. Лазер легко настраивается на абсорбционный пик паров металла, т.к. ширина полосы лазерного излучения существенно меньше полосы поглощения MVF. Преимущества последнего перед обычными фильтрами заключаются в низкой стоимости, высоком регулируемом концентрацией паров металла (температурой) поглощении, в возможности сбора света под большими углами. Подобные светофильтры используются в рамановской спектроскопии. Светофильтр Rb MVF представляет обогреваемую потоком нагретого азота герметичную цилиндрическую кварцевую ячейку размером  $d = 2.5$  см и  $l = 10$  см, заполненную инертным газом с парами Rb, обладает предельно высокой оптической плотностью при  $\lambda = 780.023$  нм. Rb имеет два изотопа  $^{85}\text{Rb}$  и  $^{87}\text{Rb}$ , которые находятся в соотношении 0.727 : 0.273 [44] и обладают собственной сверхтонкой структурой спектра. Для измерения абсорбции светофильтра капилляр мог замещаться зеркалом под углом  $45^\circ$ . Абсорбционные профили светофильтра RbMVF, представляющие конволюцию гауссова и лоренцева абсорбционных профилей Rb [45], показаны на рис. 7. Повышение температуры повышает плотность паров Rb, резко увеличивая абсорбцию (рис. 8). Абсорбционная

полоса светофильтра очень узкая (21 нм при максимуме на  $\lambda = 780.023$  нм). Идеально — когда узкая линия лазера настраивается на абсорбционный пик светофильтра RbMVF при  $100^\circ\text{C}$ . При этом достигается абсорбция в несколько тысяч единиц. Максимум абсорбции при  $170^\circ\text{C}$ ,  $D \approx 8$  и ограничивается слабым широкополосным лазерным фоном титан-сапфирового кристалла. Для предотвращения осаждения металлического Rb на окнах светофильтра последние нагревались до более высокой температуры, чем его объем. После светофильтра RbMVF и перед фотодетектором помещался узкополосный интерференционный светофильтр  $\lambda = 830$  нм с шириной полосы 10 нм, чтобы блокировать рамановское рассеяние растворителя при  $\lambda = 860$  нм. Далее свет флуоресценции фокусировался с помощью объектива  $40\times 0.65$  в световоде  $\varnothing = 100$  мкм и через него передавался на лавинный фотодиод. Последний представляет однофотонный счетный модуль с 25 % эффективностью детектирования фотонов при  $\lambda = 830$  нм и темновым током, эквивалентным 25 импульсам/с. Затем сигналы поступали на плату счетчика-таймера и обрабатывались по специальным программам с компьютера. Титан-сапфировый лазер настраивался на максимум абсорбции линии Rb ( $\lambda = 780.023$  нм) светофильтра MVF с помощью эталона Фабри—Перо. Рассчитанная ширина линии лазерного излучения при максимуме на  $\lambda = 780.023$  нм составляла 0.081 нм.

#### Методика одномолекулярного детектирования

Чтобы достичь одномолекулярного детектирования с близкой к единице эффективностью измерения, необходимо добиться полного освещения всего детектируемого объема жидкости в капилляре. Среднее время перехода молекул пробы через детектируемый объем составляет  $\approx 0.8$  мс (при скорости 0.061 мкл/мин). Возможные отклонения расхода связаны с малым диаметром капилляра, нарушением его цилиндрической формы и молекулярной диффузией. Число детектируемых молекул оказалось меньше ожидаемого из-за их адсорбции на стенках капилляра, однако при разбавлении пробы десорбция молекул со стенок капилляра увеличивала относительное число детектируемых молекул. Средняя вероятность фотодеструкции движущихся молекул измерялась по зависимости флуоресценции от скорости потока. При мощности лазера  $P_{\text{Laser}} = 150$  мВт уменьшение скорости с 1.26 до 0.061 мкл/мин (время перехода при этом увеличивается с 0.039 до 0.8 мс) приводит к уменьшению сигнала флуорес-

**Табл. 2.** Вероятность заполнения детектируемого объема (1.05 пл) молекулами красителя при  $[\text{IR140}] = 1.9 \times 10^{-13}$  М [18]

Число молекул	Вероятность
0	0.887
1	0.106
2	0.006
3	$\approx 0.000$

ценции до 85 % от максимального. Сигнал флуоресценции — линейный в пределах четырех порядков величин концентрации аналита: от  $1.9 \times 10^{-12}$  до  $1.9 \times 10^{-8}$  М (при этом среднее число молекул в объеме детектирования изменяется от 1.2 до 12 000). При использовании красителя IR140 с концентрацией  $1.9 \times 10^{-12}$  М и времени перехода 0.8 с через детектируемый объем за 1 с проходит приблизительно 1500 молекул. При концентрации  $1.9 \times 10^{-13}$  М среднее число молекул в объеме пробы 0.12. Табл. 2 показывает вероятность нахождения молекул красителя IR140 в объеме детектирования.

Как видно из таблицы, при  $[\text{IR140}] = 1.9 \times 10^{-13}$  М основную часть времени молекулы в детектируемом объеме отсутствуют ( $P(n=0) = 0.887$ ), вероятность присутствия 1 молекулы  $P(n=1) = 0.106$ , а для большего числа молекул  $P(n \geq 2) \leq 0.006$ , т.е. пренебрежимо мала. Таким образом, детектирование осуществлялось при достаточно редких фотон-аналитных контактах. Однако, как будет видно из дальнейшего, даже в этих условиях происходило  $\geq 5$  вспышек флуоресценции. Число подобных событий  $N_{\text{ev}}$  для молекул, пересекающих луч лазера в детектируемом объеме за время  $T$ , может быть рассчитано по формуле

$$N_{\text{ev}} = \frac{N_p T k}{t_r}, \quad (1)$$

где  $N_p$  — среднее число молекул в детектируемом объеме,  $T$  — время измерения,  $t_r$  — время перехода через детектируемый объем,  $k$  — число временных сегментов за время перехода. Рассчитанное  $N_{\text{ev}}$  равно 120 во время эксперимента с IR140 в концентрации, равной  $1.9 \times 10^{-13}$  М, при  $N_p = 0.12$ ,  $T = 200$  мс,  $t_r = 0.8$  с,  $k = 4$ . По расчету за 200 мс через детектируемый объем пройдет  $\approx 30$

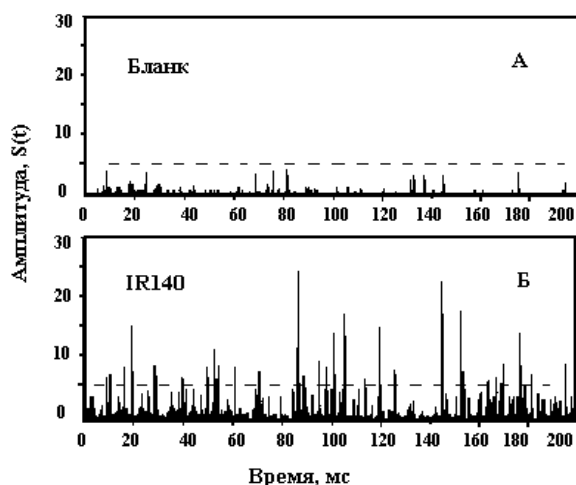


Рис. 9. Вспышки фотонов "холостого" опыта с метанолом (А) и  $1.9 \times 10^{-13}$  М раствора IR140 (Б), обработанные методом взвешенного квадратичного суммирования (WQS) с  $k = 4$ , при возбуждении лазером 100 мВт и скорости растворителя 0.061 мкл/мин (время перехода 0.8 мс). Время интегрирования 200 мкс. За время перехода через детектируемый объем проходит  $\approx 30$  молекул. Дискриминационный предел  $S(t) = 5$ , который выделяет  $\approx 110$  вспышек [18]

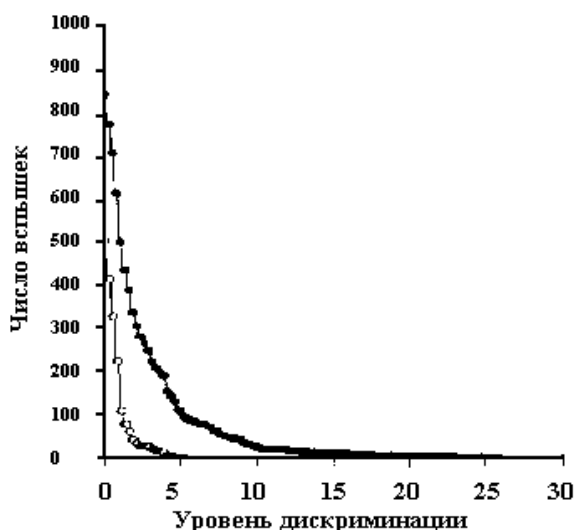


Рис. 10. Число регистрируемых вспышек как функция дискриминационного предела  $S(t)$  для  $1.9 \times 10^{-13}$  М раствора IR140 (●) и в "холостом" опыте с метанолом (○). При  $S(t) = 5$  регистрируются 110 вспышек IR140 и 1 вспышка метанола [18]. Условия эксперимента указаны на рис. 9

молекул, и все их нужно зафиксировать. Чтобы выделить из фонового сигнала вспышку фотонов индивидуальной молекулы предлагаются различные методы, описанные в работах [9, 13, 46–50]. В работе [18] для дискриминации вспышки от фона использовался фильтр взвешенного квадратичного суммирования (WQS), модифицированный методом скользящих сумм. Первичные данные возводились в квадрат и обрабатывались по алгоритму WQS-фильтра

$$S(t) = \sum_{\tau=0}^{k-1} w(\tau) d(t + \tau)^2, \quad (2)$$

где  $k$  — интервал времени, приблизительно эквивалентный времени перехода молекулы через детектируемый объем,  $w(\tau)$  — весовой фактор,  $d(t + \tau)$  — необработанные точки за время  $t + \tau$ . Ввиду отсутствия сведений о профиле излучения лазера в капилляре и эмиссии фотонов молекулой, различные весовые факторы могут дать оптимизированные  $S/N$  отношения для конкретных экспериментальных условий. Наилучшая дискриминация время-коррелированного сигнала флуоресценции от случайного фонового шума достигается при выборе весового фактора  $w(\tau)$  в виде асимметричного треугольного наклона [9, 13]

$$w(\tau) = \frac{\tau + 1}{k}. \quad (3)$$

Рис. 9 показывает результаты WQS-фильтрации для  $1.9 \times 10^{-13}$  М раствора IR140 и в "холостом" опыте с метанолом. Вспышки большой амплитуды ясно указывают на движение индивидуальной молекулы через центр лазерного луча. Вариации в амплитудах связаны с попаданием молекулы в разные зоны профиля интенсивности лазерного луча. Когда молекула проходит через край лазерного луча она претерпевает единичные циклы возбуждения и выбрасывает мало фотонов. Вариации фотоэлектронных вспышек в "холостом" опыте связаны только с флуктуациями фона и темновым током. Для определения эффективности детектирования IR-молекул строилась зависимость кумулятивного числа WQS-событий от уровня дискриминации для красителя и метанола (рис. 10). Уровень дискриминации  $S(t) = 5$  показан пунктиром на рис. 9. Число событий для красителя превышало число событий для метанола в 110 раз. Поскольку рассчитанное число событий равно 120, эффективность измерения несколько ниже 100 %, по-видимому, вследствие ошибок в определении концентрации аналита, объема пробы или адсорбции на стенках капилляра. Табл. 3 показывает общее число событий (вспышек флуоресценции) и среднее число фотоэлектронов от одной

**Табл. 3.** Число событий (вспышек флуоресценции) при использовании лазеров разной мощности [18]

Мощность лазера (мВт)	50	100	150
	Дискриминатор	3.1	5.0
Измеренный выход	112	110	116
Ожидаемый выход	120	120	120
Ср. число фотоэлектронов на молекулу	5.9	7.0	8.5

молекулы при возбуждении лазерами различной мощности. Здесь среднее число фотоэлектронов на молекулу рассчитывалось по формуле  $\sum C_i/N$ , где  $N$  — число молекул с амплитудой WQS выше дискриминатора,  $C_i$  — счет фотонов от индивидуальной молекулы по необработанным данным.

При равной эффективности детектирования увеличение мощности лазера требует повышения дискриминационного барьера. Среднее число фотоэлектронов молекулы IR140, детектируемых во время прохождения детектируемого объема, составляет 8.5; 7.0 и 5.9 при мощности лазера соответственно 150, 100 и 50 мВт. Это диктует использовать для одномолекулярного ЛИФ-детектирования непрерывные лазеры мощностью 100–150 мВт. Идеально, когда при прохождении молекулы через лазерный луч распределение эми-

тированных фотонов отражает его гауссов профиль. К сожалению, если величина фотонной вспышки мала, как это имело место в работе [18], пуассоновский шум нарушает гауссово распределение. Другое осложнение связано с прохождением молекулы через край лазерного луча. Эти осложнения затрудняют точный счет индивидуальных молекул. Реальная мощность лазера, обеспечивающая 5 счетов, позволяла использовать LOD-, а не LOG-концепцию. Табл. 4 сравнивает детектирование индивидуальных молекул IR132 и IR140 в установках с разной пространственной эффективностью. Хотя при равной эффективности детектирования средний выход фотонов у IR140 ниже, эффективность измерения R140 на 4 порядка величин выше вследствие иллюминации всего детектируемого объема капилляра возбуждающим излучением лазера.

В работе [18] реализовано несколько оригинальных решений, которые действительно обеспечили одномолекулярное детектирование: 1) использование фильтра паров металла Rb MVF с  $D \cong 8$  (для подавления рассеянного лазерного излучения); 2) освещение лазером всего детектируемого объема капилляра; 3) возбуждение флуоресценции в ближней ИК-области (для исключения фоновой флуоресценции); 4) линейность флуоресцентного сигнала в пределах 4 порядков величин концентраций (от  $1.9 \times 10^{-12}$  до  $1.9 \times 10^{-8}$  М); 5) использование для обработки сигнала цифрового взвешенного квадратичного суммирующего WQS-фильтра, позволяющего надежно извлекать индивидуальные вспышки фотонов из первичного (необработанного) сигнала.

**Табл. 4.** Сравнение одномолекулярного детектирования в ближней ИК-области красителей IR132 и IR140 (мощность лазера 150 мВт) [18]

Параметр	Краситель	
	IR132	R140
$\lambda_{\text{возб.}}$ (нм)	800	780
$\lambda_{\text{набл.}}$ (нм)	800	830 (10)
Эффективность детектирования фотонов*	0.007	0.007
Объем пробы (пл)	0.8	1.05
Время перехода (мс)	10	0.8
Ср. число электронов на молекулу	18 ( $\pm 4$ )	8.5
Эффективность детектирования (%)	97 ( $\pm 7$ )	97
Пространственная эффективность детектирования (%)	0.01	100
Эффективность измерения (%)	0.0097	97

**Примечание:** \* эффективность детектирования фотонов — произведение вероятности пропускания всех оптических сред и эффективности сбора фотонов объективами

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние несколько лет достигнуты большие успехи в области методологии и приборного обеспечения одномолекулярного детектирования в жидкости. Развитие внутрикапиллярного детектирования с одномолекулярным уровнем чувствительности имеет великолепные перспективы в аналитической химии для использования в проточном цито- и молекулярном флуориметре, иммуноанализе, анализе ДНК (сиквенс, гибридизация) [42], суперследовом анализе и миниатюризованной сепарационной технике, прежде всего капиллярном электрофорезе [18]. Будущие перспективы развития одномолекулярного детектирования видятся в увеличении его скорости и чувствительности; эффективной дискриминации различных типов молекул; уменьшении предела детектирования ниже фемтомолярного уровня; исследовании молекулярной динамики, ассоциации, изомеризации и комплексообразования индивидуальных макромолекул, в том числе иммунной реакции; поиске минорных компонентов в небольших молекулярных популяциях.

Можно сделать некоторые выводы по условиям, необходимым для реализации наиболее перспективного в настоящее время метода детектирования индивидуальных молекул в жидкости — ЛИФ-детектирования в капилляре, открывающего возможность высокоэффективного капиллярного электрофореза индивидуальных молекул, с характерными для этого метода мощными аналитическими возможностями, в том числе связанными с отделением мешающих одномолекулярному детектированию флуоресцирующих компонентов при электрофоретическом фракционировании анализа.

Поскольку вероятность детектирования молекулы анализа в пробе выше фонового шума области наблюдения, отношение  $S/N = 3(6)$  определяется уравнением

$$\varepsilon_m = \varepsilon_T \cdot \varepsilon_P \cdot \varepsilon_d, \quad (4)$$

где  $\varepsilon_d$  — эффективность детектирования вспышки флуоресценции в детектируемом объеме,  $\varepsilon_T$  — эффективность переноса пробы из точки ввода в область детектирования.  $\varepsilon_P = \varepsilon_s \cdot \varepsilon_t$ , где  $\varepsilon_s$  — пространственная,  $\varepsilon_t$  — временная эффективности детектирования.  $\varepsilon_s$  — доля анализа, попавшая в область засветки лазером и (или) наблюдаемую детектором область;  $\varepsilon_t$  — вероятность взаимодействия лазерного фотона с молекулой анализа:  $\varepsilon_t \approx 1$  для непрерывного лазера или пульсирующего источника, частота которого обеспечивает заданное (в соответствии с предельным соотношением  $S/N$ ) число встреч фотона лазера с анализом в зоне наблюдения. Таким образом, для ЛИФ-детектирования одной молекулы необходимо обеспечить

$$\varepsilon_m = \varepsilon_T \cdot \varepsilon_P \cdot \varepsilon_d \approx 1 \quad (\text{т.е. } \varepsilon_T \approx \varepsilon_P \approx \varepsilon_d \approx 1). \quad (5)$$

Тогда для  $\varepsilon_d \approx 1$  требуется:

1. Полное подавление фоновой флуоресценции (оптики, растворителя, примесей, стенок капилляра) путем перехода в ближнюю ИК-область детектирования ( $\lambda_{\text{Laser}} \geq 750$  нм).

2. Полная ликвидация засветки фотоприемного устройства рассеянным светом лазера за счет применения сверхплотных (содержащих пары металлов) светофильтров и узкополосных лазеров, прецизионно настроенных на одну частоту.

3. Использование достаточно мощного ( $\geq 100$  мВт) лазера для получения не менее 3 (LOD)–6 (LOG) флуоресцентных вспышек за время прохождения молекулой области детектирования.

4. Статистическая обработка сигнала для достоверного выделения фотонов флуоресценции анализа из фоновой флуоресценции.

5. Для  $\varepsilon_s \approx 1$  надо обеспечить полную засветку лазером детектируемого объема с диаметром капилляра  $\leq 10$  мкм.

6. Для  $\varepsilon_t \approx 1$  необходимо использовать непрерывный или импульсный лазер с частотой  $\geq 1$  кГц.

7. Для  $\varepsilon_T \approx 1$  необходимо разработать систему, обеспечивающую полный ввод пробы в капилляр.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barnes M.D., Whitten W., Ramsey J.M. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 418A–423A.
2. Moerner W.E. // *Science.* 1994. V. 265. P. 46–53.
3. Orrit M., Bernard J. // *Phys. Rev. Lett.* 1990. V. 65. P. 2716–2719.
4. Orrit M., Bernard J., Personov R.J. // *Phys. Chem.* 1993. V. 97. P. 10256–10268.
5. Betzig E., Chichester R. // *Science.* 1993. V. 262. P. 1422–1425.
6. Xie X.S., Dunn R.C. // *Science.* 1994. V. 265. P. 361–364.
7. Ambrose W.P., Goodwin P.M., Martin J.C., Keller R.A. // *Phys. Rev. Lett.* 1994. V. 72. P. 160–163.
8. Nguyen D.C., Keller R.A. // *Anal. Chem.* 1987. V. 59. P. 2158–2161.
9. Shera E.B., Seitzinger N.K., Davis L.M. et al. // *Chem. Phys. Lett.* 1990. V. 174. P. 553–556.
10. Wilkerson C.W., Goodwin P.M., Ambrose W.P. et al. // *Appl. Phys. Lett.* 1993. V. 62. P. 2030–2034.
11. Peck K., Stryer L., Glazer A.N., Mathies R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 4087–4090.
12. Mathies R.A., Peck K., Stryer L. // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. P. 1786–1791.

13. Soper S.A., Mattingly Q.L., Vegunta P. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 740–747.
14. Li L.Q., Davis L.M. // *Rev. Sci. Instrum.* 1993. V. 64. P. 1524–1527.
15. Eigen M., Rigler R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 5740–5745.
16. Nie S., Chiu D.T., Zare R.N. // *Science.* 1994. V. 266. P. 1018–1021.
17. Whitten W.B., Ramsey J.M., Arnold S., Bronk B.V. // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1027–1031.
18. Lee Y.-H., Maus R.G., Smith B.W. et al. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 4142–4149.
19. Hirshfeld T. // *Appl. Opt.* 1976. V. 15. P. 2965–2966.
20. Schwartz D.C., Koval M. // *Nature.* 1989. V. 338. P. 520–522.
21. Smith S.B., Aldridge R.K., Callis J.B. // *Science.* 1989. V. 243. P. 203–206.
22. Perkins T.T., Smith D.E., Chu S. // *Science.* 1994. V. 264. P. 819–822.
23. Smith S.B., Finzi L., Bustamante C. // *Science.* 1992. V. 258. P. 1122–1126.
24. Schafer D.A., Gelles J., Sheetz M.P., Landick R. // *Nature.* 1991. V. 352. P. 444–448.
25. Castro A., Shera E.B. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 3181–3260.
26. Haab B.B., Mathies R.A. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 3253–3186.
27. Chen D.-Y., Dovichi N.J. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 690–698.
28. Hirschfeld T. // *Appl. Opt.* 1976. V. 15. P. 3135–3139.
29. Soper S.A., Nutter H.L., Keller R.A. et al. // *Photochem. Photobiol.* 1993. V. 57. P. 972–981.
30. Basche T., Moerner W.E., Orrit M., Talon H. // *Phys. Rev. Lett.* 1992. V. 69. P. 1516–1519.
31. Whitten W.B., Ramsey J.M. // *Appl. Spectrosc.* 1992. V. 46. P. 1587–1589.
32. Kollner M. // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 806–809.
33. Ng K.C., Whitten W.B., Arnold S., Ramsey J.M. // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 2914–2920.
34. Barnes M.D., Ng K.C., Whitten W.B., Ramsey J.M. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 2360–2365.
35. Magde D., Elson E., Webb W.W. // *Phys. Rev. Lett.* 1972. V. 29. P. 705–708.
36. Schneider M.B., Webb W.W. // *Appl. Opt.* 1981. V. 20. P. 1382–1385.
37. Koppel D.E. // *Phys. Rev. A* 1974. V. 10. P. 1938.
38. Arnold S., Folan L.M. // *Rev. Sci. Instrum.* 1986. V. 57. P. 2250–2253.
39. Barnes M.D., Whitten W.B., Arnold S. et al. // *J. Chem. Phys.* 1992. V. 97. P. 7842–7847.
40. Benner R.E., Barber R.E., Owen J.F. et al. // *Phys. Rev. Lett.* 1980. V. 44. P. 475–478.
41. Barnes M.D., Whitten W.B., Arnold S. et al. // *J. Opt. Soc. Am. B.* 1994. V. 11. P. 1297–1301.
42. Castro A., Fairfield F.R., Shera F.R. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 849–852.
43. Albin M., Grossman P.D., Moring S.E. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 489 A–497 A.
44. Beacham J.R., Andrew K.L. // *Opt. Soc. Am.* 1971. V. 61, N. 2. P. 231–235.
45. Puerta J., Martin P. // *Appl. Opt.* 1981. V. 20, N. 22. P. 3923–3928.
46. Stevenson C.L., Winefordner J.D. // *Appl. Opt.* 1992. V. 46. P. 715–724.
47. Stevenson C.L., Winefordner J.D. // *Appl. Opt.* 1992. V. 46. P. 407–419.
48. Stevenson C.L., Winefordner J.D. // *Appl. Opt.* 1991. V. 45. P. 1217–1224.
49. Soper S.A., Davis L.M., Shera E.B. // *J. Opt. Soc. Am. B.* 1992. V. 9. P. 1761–1769.
50. Soper S.A., Davis L.M., Farfield F.R. et al. // *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Instrum. Eng. "Optical Methods for Ultrasensitive Detection and Analysis: Techniques and Applications"*/ Feary D.J., ed. 1991. V. 1435. P. 168–178.

*Институт аналитического приборостроения РАН,  
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 26.05.2001.

## SINGLE MOLECULE DETECTION IN LIQUID. ANALYSIS OF SAMPLES BELOW $1 \times 10^{-15}$ M. HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH SINGLE-MOLECULAR LIF DETECTION

**B. G. Belenkii, R. A. Kozulin, V. E. Kurochkin**

*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

Methods and criteria of single-molecular detection in liquid are considered. Particular attention is given to detection of single molecules in capillary electrophoresis by the laser-induced fluorescence technique. The main experimental difficulties encountered in this field are stressed.