

УДК 57.08, 681.723.27

© Е. К. Васильева, И. В. Чубинский-Надеждин, В. Е. Курочкин,
Я. И. Алексеев, Ю. В. Куликов, 2024

РАЗРАБОТКА УСТРОЙСТВА ДЛЯ НАСТРОЙКИ И ПРОВЕРКИ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ДЛЯ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Описана разработка устройства для настройки и тестирования оптической системы секвенатора ДНК для массового параллельного секвенирования. Устройство содержит микрофлюидную ячейку с флуоресцентными микросферами, иммобилизованными на плоской поверхности канала ячейки. Микросферы диаметром 1 мкм служат моделью флуоресцентных колоний фрагментов ДНК, образующихся в ходе амплификации и последующего секвенирования. Рассмотрен метод иммобилизации стабильного монослоя микросфер на поверхности канала ячейки.

Кл. сл.: секвенатор ДНК, колонии ДНК, флуоресцентные микросферы, микрофлюидная ячейка, оптическая система, цифровые изображения

ВВЕДЕНИЕ

Один из современных методов массового параллельного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) — секвенирование путем синтеза [1–5] — применяется при решении задач медицины и биологии, требующих расшифровки больших объемов нуклеотидных последовательностей ДНК. В генетических анализаторах, построенных на платформе компании Illumina® [2] и подобных, использующих эту технологию, в канале проточной микрофлюидной ячейки формируются десятки миллионов молекулярных колоний различных фрагментов ДНК. Каждая колония локализована в пределах площадки менее 1 мкм² поверхности канала ячейки и представляет собой множество клоноводного отдельного фрагмента ДНК. Большое число колоний, расположенных с поверхностной плотностью до 10⁶ шт/мм², обеспечивает статистическую представительность ансамбля различных фрагментов расшифровываемой ДНК.

На следующем этапе производится циклический синтез комплементарных цепочек фрагментов ДНК в каждой колонии, при этом в одном цикле каждая цепочка колонии удлиняется на один комплементарный нуклеотид. Встраивающиеся в синтезируемые цепочки нуклеотиды несут флуоресцентные метки с разными спектральными диапазонами ("цветами") эмиссии — условно G, T, A, C по первым буквам соответствующих нуклеиновых оснований: гуанина, тимина, аденина, цитозина. Поэтому под действием возбуждающего лазерного излучения каждая колония в текущем цикле светится одним из четырех

"цветов" в соответствии со спектром эмиссии присоединенных к нему в данном цикле меченых нуклеотидов.

В каждом цикле регистрируют сигналы флуоресценции всех колоний, и последовательность "цветов" детектируемой эмиссии каждой колонии в нескольких десятках-сотнях циклов синтеза отражает уникальную последовательность встроенных нуклеотидов в данной колонии.

Одновременная детекция четырехцветной лазер-индуцированной флуоресценции большого числа колоний ДНК осуществляется методами цифровой люминесцентной микроскопии и компьютерной обработки цифровых микроскопических изображений ансамблей колоний. Оптическая система генетического анализатора должна обеспечивать построение изображений распределения колоний на поверхности канала микрофлюидной ячейки площадью до десятков квадратных миллиметров с субмикронным пространственным разрешением, возбуждение и регистрацию их флуоресценции в четырех спектральных полосах в диапазоне приблизительно от 530 нм до 730 нм.

Для настройки такой сложной оптической системы и проверок правильности ее работы удобно иметь устройство, имитирующее микрофлюидную ячейку с выращенными молекулярными колониями, которое долговременно сохраняло бы свои характеристики. Например, в качестве моделей субмикронных флуоресцирующих колоний можно использовать подходящие флуоресцирующие полимерные микросферы, размещенные на внутренней поверхности ячейки.

Известные устройства для настройки оптических систем, работающих с флуоресцентными сигналами микрообъектов, такие как флуоресцентные оптические миры или пластины с лунками, содержащими окрашенные микросферы [6–7], как правило, могут быть использованы для тестирования только конкретных приборов.

Целью данной работы являлось создание подобного устройства тестирования на базе наборов флуоресцирующих микросфер для настройки и проверки оптической и сканирующей систем генетического анализатора "Нанофор СПС" (разработан ИАП РАН и ООО "Синтол").

Предложенное решение заключается в размещении микросфер на внутренней поверхности канала такой же микрофлюидной ячейки, которая используется для секвенирования в анализаторе "Нанофор СПС". Это обеспечивает проверку работы оптической системы в контролируемых условиях, полностью имитирующих свечение колоний ДНК в процессе секвенирования. Микросферы должны быть подобраны по размерам и по спектральным характеристикам флуоресценции, при этом флуоресценция должна быть долговременно стабильна при воздействии лазерного излучения. Важно зафиксировать необходимое количество частиц на рабочей внутренней поверхности канала микрофлюидной ячейки — микросферы не должны смещаться ни в ходе использования устройства, ни с течением времени.

ВЫБОР ПОДХОДЯЩИХ МИКРОСФЕР

Среди разнообразных коммерчески доступных наборов микросфер были выбраны частицы "Fluo-Spheres®" и "FocalCheck™ Thin-Ring Fluorescent Microspheres Kit" от производителя Thermo Fisher Scientific [8]. Они флуоресцируют в четырех спектральных диапазонах, которые достаточно близки к спектрам флуоресценции меченых нуклеотидов при секвенировании. Суспензии микросфер имеют высокую концентрацию (табл. 1), что удобно при создании нужной поверхностной плотности частиц на поверхности канала микрофлюидной ячейки. Микросферы имеют подходящий диаметр — 1.0 мкм.

Здесь целесообразно отметить, что длины волн лазерных источников возбуждения флуоресценции генетического анализатора составляют около 515 нм для каналов G, T и около 638 нм для каналов A, C. Эмитированное излучение регистрируется одновременно в четырех каналах в диапазонах 540–580 нм (G), 590–625 нм (T), 650–675 нм (A) и 680–730 нм (C).

Интенсивность свечения выбранных микросфер достаточна для визуализации одиночных частиц. Как указывает производитель, фотовыцветание микросфер под действием интенсивного лазерного излучения незначительно. Это подтвердили и наши многочисленные экспериментальные оценки при плотности мощности лазерного излучения до 200 мВт/мм² (длина волны 515 нм).

Табл. 1. Характеристики флуоресцирующих микросфер

Краситель (условное название)	Длина волны максимума возбуждения, нм	Длина волны максимума эмиссии, нм	Концентрация, частиц/мл	Канал регистрации флуоресценции
Зеленый	540	560	4×10^{10}	G
Оранжевый	580	605	4×10^{10}	T
Красный	625	645	4×10^{10}	A
Темно-красный	660	680	3×10^8	C

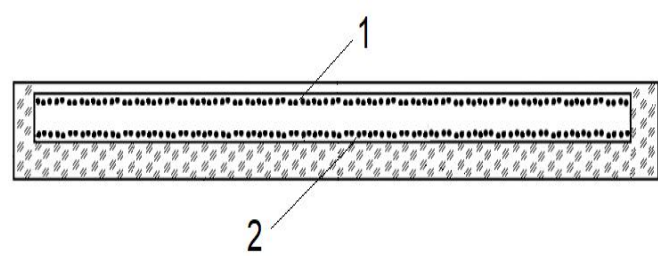


Рис. 1. Разрез рабочего участка канала микрофлюидной ячейки.
1 — колонии на верхней внутренней поверхности канала; 2 — колонии на нижней внутренней поверхности

Выбранные наборы микросфер представляют собой суспензии частиц в буферном растворе с различной концентрацией — от 0.02% до 2% твердого вещества. Для уточнения исходной концентрации микросфер во флаконах образцы с этими частицами разбавили в 10^4 раз и провели подсчет микросфер в камере Горяева в 15–20 полях зрения, используя прибор ДСКФ-01 [9]. Исходную концентрацию частиц FluoSpheres оценили около 4×10^{10} шт/мл, а частиц FocalCheck — 3×10^8 шт/мл (см. табл. 1).

УМЕНЬШЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ МИКРОСФЕР

Микрофлюидная ячейка в разрезе показана на рис. 1. Она представляет собой ячейку, у которой верхняя и нижняя внутренние поверхности канала параллельны друг другу. Ввод лазерного излучения и выход флуоресценции осуществляется через верхнюю прозрачную поверхность. Ячейка имеет порты для ввода и вывода аналита и реагентов. Молекулярные колонии при секвенировании локализованы на верхней и нижней плоских поверхностях канала (рис. 1). Соответственно, флуоресцирующие микросферы устройства тестирования должны быть локализованы аналогичным образом.

Одной из важных решенных задач стал способ иммобилизации микросфер на поверхностях канала ячейки и формирование из них монослоя, что обеспечило совпадение условий тестирования с условиями реальной процедуры секвенирования.

Для упрощения процедур настройки и тестирования прибора желательно, чтобы микросферы не смещались на внутренней поверхности канала в процессе сканирования образца и их взаимное расположение в разных полях зрения сохранялось. После ввода в канал буферного раствора с микросферами диаметром около 1 мкм и менее они обычно не оседают на дно канала (в отличие от микросфер размером более 3–5 мкм), а хаотически смещаются как вдоль поверхности, так и по глубине канала ячейки. С целью уменьшения подвижности микросфер была увеличена вязкость раствора, в котором они находятся.

При подборе вязкости суспензию с микросферами смешивали в различных соотношениях с прозрачным полимеризующим гелем на основе линейного N,N-полидиметилакриламида (ООО "Синтол", Москва). У используемого геля практически не обнаруживается собственная флуоресценция. Его добавляли к суспензии с микросферами в разных долях с целью найти такое соотношение геля и суспензии, при котором микросферы

перестают заметно смещаться, но при этом могут за приемлемое время осесть на поверхность микрофлюидной ячейки, разместившись в виде монослоя частиц без образования при этом крупных агрегатов. При избыточной доле геля возникают затруднения при вводе микросфер в канал микрофлюидной ячейки.

Эксперименты проводили при регистрации на приборе ДСКФ-01 цифровых изображений внутренней рабочей поверхности камеры Горяева с введенными суспензиями микросфер. Прибор работал в режиме цифрового микроскопа [9] с объективом 20× и обеспечивал пространственное разрешение не хуже 1 мкм при шаге дискретизации менее 0.4 мкм (рис. 2). Глубина резкости составляла несколько микрометров, что позволяло при сниженных подвижностях микросфер пренебречь дрейфом по "глубине" канала и следить только за проекциями смещений микросфер на горизонтальную плоскость (X, Y).

Оценку дрейфа частиц проводили (после калибровки шага дискретизации по сетке камеры Горяева) для нескольких десятков микросфер сразу после внесения образца в ячейку и через определенные промежутки времени — несколько раз в течение часа, через несколько часов, через сутки, через несколько дней.

При добавлении геля в суспензию с микросферами в долях от 10% до 25% микросферы сохраняли свою подвижность. Зафиксированы колебания, смещения и единичные длинные перемещения частиц в пределах кадра изображения.

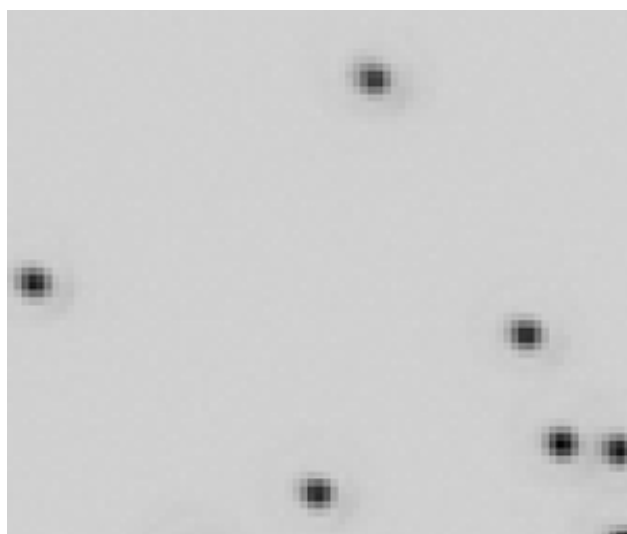


Рис. 2. Фрагмент изображения микросфер в камере Горяева в проходящем свете

Табл. 2. Средняя величина смещения частиц по координатам X и Y

Координата	Смещение частиц, мкм/мин, при концентрации геля		
	50%	75%	90%
X	1.2 ± 1.0	0.5 ± 0.6	0.0
Y	0.9 ± 1.0	0.7 ± 0.7	0.0

Взаимное положение частиц полностью менялось в течение 5–10 мин, наблюдались агрегаты, составившие более 10% от частиц-синглетов.

При смешивании геля и суспензии в соотношении 50 : 50% и 75 : 25% подвижность микросфер значительно уменьшилась, были отмечены колебания и небольшие перемещения частиц — менее 1 мкм/мин. Конфигурация расположения микросфер со временем также радикально менялась и не была узнаваема визуально.

При добавлении 90% доли полимеризующего геля в смесь с микросферами отмечены практически полное прекращение движения частиц (табл. 2) и хорошая стабильность образца в течение нескольких дней, а также небольшое количество агрегатов — не более 1.5% от общего числа частиц.

При использовании микрофлюидной ячейки с флуоресцирующими микросферами для тестирования оптической системы секвенатора важно сформировать на внутренней поверхности канала монослой микросфер, толщина которого не превышает или соизмерима с глубиной резкости оптической системы. Расположение частиц в одной (фокальной) плоскости позволяет осуществлять адекватную настройку фокусировки изображений микронных и субмикронных объектов. В этой связи для более качественного и ускоренного осаждения микросфер на плоскость поверхности канала оказалось целесообразным центрифугировать суспензию с гелем в микрофлюидной ячейке при 4500 об/мин в течение 10–15 мин. Выбрать ту поверхность канала, на которой преимущественно будут осаждаться и фиксироваться микросферы, можно путем выбора ориентации микрофлюидной ячейки в центрифуге.

Концентрация микросфер в суспензии должна быть подобрана таким образом, чтобы после центрифугирования они распределялись равномерно на поверхности канала устройства тестирования, не образуя крупных агрегатов (более 3–4 частиц), а расстояния между соседними микросферами превышали по крайней мере 2–3 их диаметра. При осаждении могут образовываться агрегаты по 2, 3 и больше частиц, но число указанных агре-

гатов должно быть на порядок меньше общего количества осажденных и зафиксированных микросфер.

В принципе, количество микросфер на поверхности канала ячейки можно сделать сопоставимым с числом молекулярных колоний в канале во время секвенирования. Однако поверхностная плотность микросфер около 10^6 шт/мм², обычная для колоний в микрофлюидной ячейке секвенатора, не подходит для устройства тестирования, где удобно иметь на поверхности канала преимущественно неосприкасающиеся единичные частицы. Подбором концентрации частиц в смеси геля и суспензии микросфер (от 10^5 шт/мл до 10^{10} шт/мл), вводимой в канал ячейки, можно обеспечить диапазон плотностей микросфер на поверхности канала от 10^2 шт/мм² до 10^6 шт/мм².

Изображения фрагмента поверхности канала устройства тестирования с флуоресцирующими микросферами и фрагмента канала микрофлюидной ячейки секвенатора со светящимися колониями ДНК представлены на рис. 3 и рис. 4 соответственно. Изображения получены с помощью оптической системы генетического анализатора "Нанофор СПС" [10]. Для удобства отображения цвета рисунков инвертированы — светящиеся микросферы или колонии на черном фоне представлены как темные круги на светлом поле. В нижней части рисунков показаны профили интенсивности флуоресценции частиц вдоль строки изображения, выделенной маркером. Расчетное значение шага дискретизации изображений равно 0.28 мкм/пиксель с учетом увеличения оптической системы. На графиках по горизонтальной оси — номер пикселя, по вертикальной — относительная интенсивность флуоресценции.

При сравнении общего вида цифровых изображений массивов флуоресцирующих частиц (рис. 3 и 4) и профилей сигналов флуоресценции микросфер и молекулярных колоний не обнаруживаются заметные отличия, которые могли бы повлиять на правильность настройки оптической системы секвенатора с помощью устройства тестирования с микросферами. Представляется, что успешная реализация устройства тестирования оптической

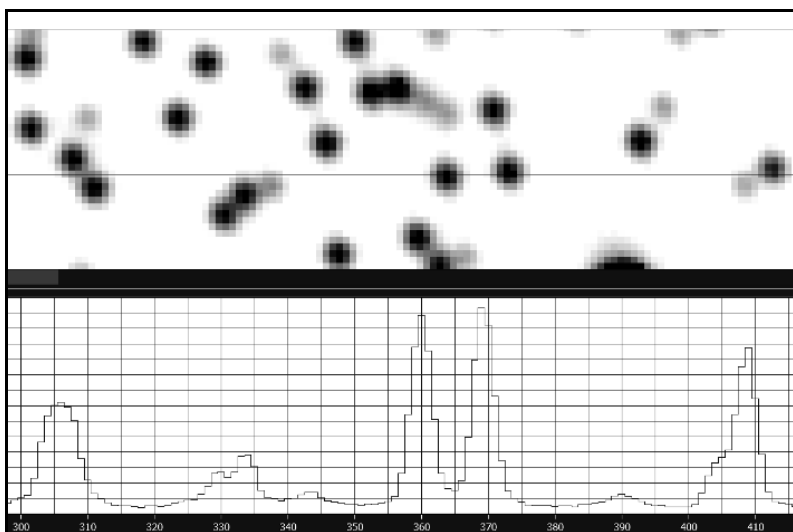


Рис. 3. Изображение фрагмента канала устройства тестирования с микросферами и профиль интенсивности флуоресценции вдоль выделенной строки

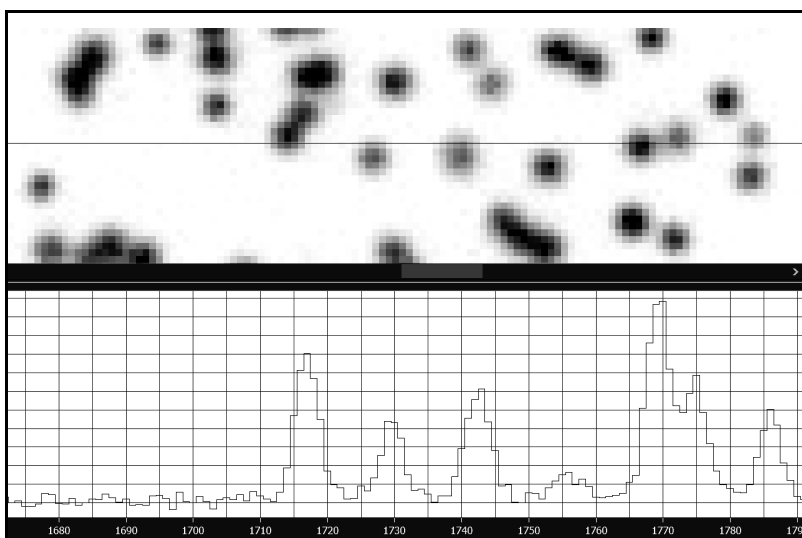


Рис. 4. Изображение фрагмента канала микрофлюидной ячейки с колониями ДНК и профиль интенсивности флуоресценции вдоль выделенной строки

системы возможна при использовании описанных выше подходов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, светящиеся колонии ДНК, формирующиеся в процессе секвенирования, могут быть смоделированы флуоресцентными микросферами микронного размера, зафиксированными на внутренней поверхности канала микрофлюидной ячейки генетического анализатора. Спектры эмиссии микросфер могут быть подобраны в близком соответствии со спектральными каналами регистрации флуоресцентных меток нуклеотидов, которые используются при синтезе

фрагментов ДНК в процессе секвенирования. Суспензию из четырех типов микросфер смешивают с гелем для иммобилизации в виде монослоя частиц с концентрацией микросфер от 10^2 шт/мм² до 10^6 шт/мм².

Микрофлюидная ячейка генетического анализатора, в которую введена смесь (суспензия микросфер + гель), представляет собой устройство для тестирования оптической системы генетического анализатора для массового параллельного секвенирования.

Устройство позволяет настраивать фокусировку оптической системы в четырех спектральных каналах регистрации, производить коррекцию совмещения цифровых изображений различных спектральных каналов, тестировать оптическую

систему на наличие аберраций, настраивать и проверять равномерность засветки поля зрения оптической системы в четырех спектральных каналах, проводить настройку и тестирование системы точного сканирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bentley R.D., Balasubramanian S., Swerdlow H.P. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry // *Nature*. 2008. Vol. 456, no. 6. P. 53–59. DOI: 10.1038/nature07517
2. Sequencing platforms. URL: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
3. Shendure J., Balasubramanian S., Church G.M., Gilbert W et al. DNA sequencing at 40: past, present and future // *Nature*. 2017. Vol. 550. P. 345–353. DOI: 10.1038/nature24286.
4. Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques // *New Biotechnology*. 2009. Vol. 25, no. 4. P. 195–203. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.12.009
5. Бородинов А.Г., Манойлов В.В., Заруцкий И.В., Петров А.И., Курочкин В.Е. Поколения методов секвенирования ДНК // *Научное приборостроение*. 2020. Т. 30. № 4. С. 3–20.
URL: <http://iairas.ru/mag/2020/abst4.php#abst1>
6. Sammak P., Rosania G., Zana L., et al. Microbead-based test plates and test methods for fluorescence imaging systems. Патент США US20020098588A1.
7. Эрн Д.Г., Пинто Д.Ф., Боуэн М.Ш. и др. Testing device and method of its use. Патент РФ № RU2701875C1. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2701875C1/en>
8. Thermo Fisher Scientific (дата обращения 12.09.2021). URL: <https://www.thermofisher.com/>
9. Курочкин В.Е., Чубинский-Надеждин И.В. и др. Выявление основных популяций лимфоцитов с помощью цитометрии по изображениям // *Медицинская техника*. 2019. Т. 53, № 3 (315). С. 5–8. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=38215577>
10. Институт аналитического приборостроения. Каталог приборов. URL: <http://iairas.ru/catalog.php>

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Васильева Е.К., Чубинский-Надеждин И.В., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И., Куликов Ю.В.)

ООО "НПФ СИНТОЛ", Москва (Алексеев Я.И.)

Контакты: Васильева Екатерина Кимовна, virtkat@mail.ru

Материал поступил в редакцию 04.09.2024

DEVELOPMENT OF A DEVICE FOR SETTING UP AND CHECKING OPTICAL SYSTEM OF GENETIC ANALYZER FOR MASSIVE PARALLEL SEQUENCING

E. K. Vasil'eva¹, I. V. Chubinskiy-Nadezhdin¹, V. E. Kurochkin¹,
Y. I. Alekseev^{1,2}, Yu. V. Kulikov¹

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia*

²*LLC SINTOL, Moscow, Russia*

The development of a device for adjusting and testing the optical system of a DNA sequencer for massively parallel sequencing (MPS) is described. The device contains a microfluidic cell with fluorescent microspheres immobilized on the flat surface of the chip channel. Microspheres with a diameter of 1 μm serve as a model of fluorescent colonies of DNA fragments formed during amplification and subsequent sequencing. A method for immobilizing a stable monolayer of microspheres on the surface of the chip channel is considered.

Keywords: sequencer DNA, DNA colonies, fluorescent microspheres, microfluidic cell, optical system, digital images

REFERENCES

1. Bentley R.D., Balasubramanian S., Swerdlow H.P. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 2008, vol. 456, no. 6, pp. 53–59. DOI: 10.1038/nature07517
2. Illumina. *Sequencing platforms*. URL: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
3. Shendure J., Balasubramanian S., Church G.M., Gilbert W et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 2017, vol. 550, pp. 345–353. DOI: 10.1038/nature24286.
4. Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 2009, vol. 25, no. 4, pp. 195–203. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.12.009
5. Borodinov A.G., Manoilov V.V., Zarutsky I.V., Petrov A.I., Kurochkin V.E. [Generations of DNA sequencing methods (review)]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2020, vol. 30, no. 4, pp. 3–20. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/mag/2020/abst4.php#abst1>
6. Sammak P., Rosania G., Zana L., et al. *Microbead-based test plates and test methods for fluorescence imaging systems*. Patent USA no. US20020098588A1.
7. Ernie D.G., Pinto J.F., Bowen M.S. et al. *Testing device and method of its use*. Patent RF no. RU2701875C1. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2701875C1/en>
8. Thermo Fisher Scientific. *Applied Biosystems VeritPro Dx Thermal Cycler* (accessed 12.09.2021). (In Russ.). URL: <https://www.thermofisher.com/>
9. Kurochkin V.E., Chubinskiy-Nadezhdin I.V., et al. [Detection of major lymphocyte populations by image cytometry]. *Meditinskaya tekhnika* [Medical technology], 2019, vol. 53, no. 3 (315), pp. 5–8. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=38215577>
10. Institute for analytical instrumentation Russian Academy of Science. *Instrument catalog*. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/catalog.php>

Contacts: Vasil'eva Ekaterina Kimovna,
virtkat@mail.ru

Article received by the editorial office on 04.09.2024

INTRODUCTION

One of the modern methods of massively parallel sequencing (Next Generation Sequencing, NGS) — sequencing by synthesis [1–5] — is used to solve problems in medicine and biology that require decoding large volumes of DNA nucleotide sequences. In genetic analyzers built on the Illumina® platform [2] and similar ones that use this technology, tens of millions of molecular colonies of various DNA fragments are formed in the channel of a flow microfluidic cell. Each colony is localized within the site less than $1\ \mu\text{m}^2$ of the cell channel surface and represents a multitude of cloned individual DNA fragments. A large number of colonies located with a surface density of up to $10^6\ \text{pcs}/\text{mm}^2$ ensures statistical representativeness of the ensemble of various fragments of the decoded DNA.

In the next step, a cyclic synthesis of complementary strands of DNA fragments in each colony is carried out, while in one cycle each strand of the colony is extended per complementary nucleotide. Nucleotides that integrate into the synthesized chains carry fluorescent labels with different spectral ranges ("colors") of emission — conventionally G, T, A, C according to the first letters of the corresponding nucleic bases: guanine, thymine, adenine, and cytosine. Therefore, under the influence of excitatory laser radiation, each colony in the current cycle glows with one of four "colors" in accordance with the emission spectrum of the labeled nucleotides attached to it in this cycle.

Fluorescence signals of all colonies are recorded in each cycle; the sequence of "colors" of detected emission of each colony in several tens to hundreds of synthesis cycles reflects the unique sequence of embedded nucleotides in a given colony.

Simultaneous detection of four-color laser-induced fluorescence of a large number of DNA colonies is carried out by methods of digital luminescence microscopy and computer processing of digital microscopic images of colony ensembles. The optical system of the genetic analyzer should ensure the construction of images of the distribution of colonies on the surface of the channel of a microfluidic cell with an area of up to tens of square millimeters with submicron spatial resolution, excitation, and recording of their fluorescence in four spectral bands in the range of approximately 530 nm to about 730 nm.

To set up such a complex optical system and check its correct operation, it is convenient to have a device that imitates a microfluidic cell with grown molecular colonies and retains its characteristics for a long time. Models of submicron fluorescent colonies, for instance, can be created by placing appropriate fluorescent polymer microspheres on the inside of the cell. Generally speaking, only particular devices can be

tested using known tools for modifying optical systems that use fluorescent signals from microobjects, such as fluorescent optical mires or plates with wells holding colored microspheres [6–7].

The aim of this work was to create a similar testing device based on sets of fluorescent microspheres for setting up and checking the optical and scanning systems of a genetic analyzer *Нанофоп* CIIC genetic analyzer (produced by the IAI RAS and Sintol LLC).

The proposed solution consists in the arrangement of microspheres on the internal surface of the same microfluidic cell that is used for sequencing in the *Нанофоп* CIIC analyzer. This ensures that the optical system is tested under controlled conditions that fully simulate the glow of DNA colonies during sequencing. The microspheres must be selected by size and spectral characteristics of fluorescence, and the fluorescence must be stable over a long period of time when exposed to laser radiation. It is important to fix the required number of particles on the working inner surface of the microfluidic cell channel — the microspheres must not shift either during use of the device or over time.

SELECTION OF SUITABLE MICROSPHERES

FluoSpheres® and FocalCheck™ Thin-Ring Fluorescent Microspheres Kit of Thermo Fisher Scientific were selected from a variety of commercial microsphere sets [8]. They fluoresce in four spectral bands that are close enough to the fluorescence spectra of labeled nucleotides during sequencing. Microsphere suspensions have a high concentration (Tab. 1), which is convenient when creating the desired surface density of particles on the surface of the microfluidic cell channel. The microspheres have a suitable diameter of $1.0\ \mu\text{m}$.

Tab. 1. Characteristics of fluorescent microspheres

It should be noted that the wavelengths of the laser sources of fluorescence excitation of the genetic analyzer are about 515 nm for channels G, T and about 638 nm for channels A, C. Emitted radiation is recorded simultaneously in four channels in the ranges 540–580 nm (G), 590–625 nm (T), 650–675 nm (A) and 680–730 nm (C).

The intensity of the selected microspheres is sufficient to visualize single particles. As the manufacturer points out, the photocolumination of microspheres under the influence of intense laser radiation is insignificant. This was confirmed by our numerous experimental estimates for the power density of laser radiation up to $200\ \text{mW}/\text{mm}^2$ (wavelength 515 nm).

The selected sets of microspheres are suspensions of particles in a buffer solution with various concentrations — from 0.02% to 2% of solid substance. To clarify the initial concentration of microspheres in vials, samples with these particles were 104-fold diluted, and the microspheres were counted in a Goryaev chamber in 15–20 fields of view using the ДСКФ-01 device [9]. The initial concentration of FluoSpheres particles was estimated at about 4×10^{10} pcs/mL, and FocalCheck particles — 3×10^8 pcs/mL (see Tab. 1).

REDUCING MOBILITY AND SELECTING THE OPTIMAL CONCENTRATION OF MICROSPHERES

A microfluidic cell is shown in section in Fig. 1. It is a cell in which the upper and lower inner surfaces of the channel are parallel to each other. Input of laser radiation and output of fluorescence are carried out through the upper transparent surface. The cell has ports for the input and output of analytes and reagents. Molecular colonies during sequencing are localized on the upper and lower flat surfaces of the channel (Fig. 1). Accordingly, the fluorescent microspheres of the testing device should be localized in a similar manner.

Fig. 1. Cross section of the work area of the microfluidic cell channel.
1 — colonies on the upper inner surface of the channel; 2 — colonies on the lower inner surface

One of the important tasks solved was the method of immobilizing microspheres on the surfaces of the cell channel and forming a monolayer from them to ensure the coincidence of testing conditions with the conditions of the actual sequencing procedure.

To simplify the setup and testing procedures of the device, it is desirable that the microspheres do not shift on the inner surface of the channel during the scanning of the sample and that their mutual arrangement in different fields of view is preserved. After introducing a buffer solution with microspheres of about 1 μm or less in diameter into the channel, they usually do not settle to the bottom of the channel (unlike microspheres larger than 3–5 μm), but shift chaotically both along the surface and along the depth of the cell channel. In order to reduce the mobility of the microspheres, the viscosity of the solution in which they are located was increased.

When selecting the viscosity, the suspension with microspheres was mixed in various proportions with a transparent polymerizing gel based on linear N,N-polydimethylacrylamide (Sintol LLC, Moscow). The gel used shows virtually no intrinsic fluorescence. It was added to the suspension with microspheres in dif-

ferent proportions in order to find such a ratio of gel and suspension at which the microspheres cease to noticeably shift while they can settle to the surface of the microfluidic cell in a reasonable time, being arranged in the form of a monolayer of particles without the formation of large aggregates. With an excessive proportion of gel, difficulties arise in introducing microspheres into the channel of the microfluidic cell.

The experiments were carried out by recording digital images of the internal working surface of the Goryaev chamber with introduced suspensions of microspheres on a ДСКФ-01 device. The device worked in digital microscope mode [9] with a 20 $\times$ lens and provided a spatial resolution of at least 1 μm with a sampling step of less than 0.4 μm (Fig. 2). The depth of field was several micrometers, which made it possible, with reduced microsphere motions, to neglect drift along the "depth" of the channel and monitor only the projections of microsphere displacements on the horizontal plane (X, Y).

Fig. 2. Fragment of the image of microspheres in Goryaev's chamber in transmitted light

The particle drift was assessed (after calibrating the sampling step using the Goryaev chamber grid) for several dozen microspheres immediately after introducing the sample into the cell and at certain intervals of time — several times within an hour, after several hours, after a day, after several days.

After the gel was added to the microsphere suspension in fractions of 10% to 25%, the microspheres maintained their mobility. Oscillations, displacements, and single long movements of particles within the image frame are recorded.

The relative position of the particles completely changed within 5–10 minutes; aggregates of more than 10% of singlet particles were observed.

When mixing the gel and suspension in a ratio of 50 : 50% and 75 : 25%, the mobility of the microspheres was significantly reduced; fluctuations and small particle movements of less than 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ were noted. The arrangement of microspheres also changed radically over time and was not visually recognizable.

After adding 90% of the polymerizing gel to the mixture with microspheres, there was almost complete cessation of particle movement (Tab. 2) and good stability of the sample for several days, as well as a small amount of aggregates — not more than 1.5% of the total number of particles.

Tab. 2. Average displacement of particles along the X and Y coordinates

When using a microfluidic cell with fluorescent microspheres for testing the optical system of the se-

quencer, it is important to form a monolayer of microspheres on the inner surface of the channel; the thickness of the layer should be comparable to or not exceed the depth of field of the optical system. The arrangement of particles in one (focal) plane allows for adequate adjustment of the focusing of images of micron and submicron objects. In this regard, for a higher-quality and faster deposition of microspheres on the plane of the channel surface, it turned out to be advisable to centrifuge the suspension with the gel in a microfluidic cell at 4500 rpm for 10–15 min. The channel surface on which the microspheres will be predominantly deposited and fixed can be selected by choosing the orientation of the microfluidic cell in the centrifuge.

The concentration of microspheres in the suspension should be selected so that after centrifugation they are distributed uniformly on the surface of the testing device channel without forming large aggregates (more than 3–4 particles), and the distances between neighboring microspheres exceed at least 2–3 of their diameters. During sedimentation, aggregates of 2, 3 or more particles may form, but the number of these aggregates should be an order of magnitude less than the total number of sedimented and fixed microspheres.

In principle, the number of microspheres on the surface of the cell channel can be made comparable with the number of molecular colonies in the channel during sequencing. However, the surface density of microspheres of about 10^6 pcs/mm², typical for colonies in the microfluidic cell of the sequencer, is not suitable for the testing device, where it is convenient to have predominantly non-touching single particles on the channel surface. By selecting the concentration of particles in the mixture of gel and microsphere suspension (from 10^5 pcs/mL to 10^{10} pcs/mL), introduced into the cell channel, it is possible to provide a range of microsphere densities on the channel surface from 10^2 pcs/mm² to 10^6 pcs/mm².

Fig. 3. Image of testing device channel fragment with microspheres and fluorescence intensity profile along the highlighted line

Fig. 4. Image of microfluidic cell channel fragment with DNA colonies and fluorescence intensity profile along the highlighted line

Images of a fragment of the surface of a channel of a testing device with fluorescent microspheres and a fragment of a channel of a microfluidic cell of a sequencer with luminous DNA colonies are shown in Fig. 3 and Fig. 4, respectively. The images were ob-

tained using the optical system of the genetic analyzer *Нанофоп СИС* [10].

For ease of display, the colors of the figures are inverted — luminous microspheres or colonies on a black background are presented as dark circles on a light background. The lower part of the figures shows the fluorescence intensity profiles of the particles along the image line highlighted by a marker. The calculated value of the image sampling step is $0.28 \mu\text{m}/\text{pixel}$, taking into account the magnification of the optical system. On the graphs, there is a pixel number on the horizontal axis, the relative fluorescence intensity value — on the vertical axis.

When comparing the general appearance of digital images of fluorescent particle arrays (Figs. 3 and 4) and the fluorescence signal profiles of microspheres and molecular colonies, no noticeable differences are found that could affect the correct adjustment of the optical system of the sequencer using the microsphere testing device. It is believed that successful implementation of the optical system testing device is possible using the approaches described above.

CONCLUSION

Thus, the luminescent DNA colonies formed during sequencing can be modeled by micron-sized fluorescent microspheres fixed on the inner surface of the channel of the microfluidic cell of the genetic analyzer. The emission spectra of the microspheres can be selected in close correspondence with the spectral channels of recording the fluorescent nucleotide labels used in the synthesis of DNA fragments during sequencing. A suspension of four types of microspheres is mixed with immobilization gel in the form of a monolayer of particles with a microsphere concentration of 10^2 pcs/mm² up to 10^6 pcs/mm².

The microfluidic cell of the genetic analyzer into which the mixture (microsphere suspension + gel) is introduced, is a device for testing the optical system of the genetic analyzer for mass parallel sequencing.

The device allows you to adjust the focusing of the optical system in four spectral recording channels, perform correction of the combination of digital images of different spectral channels, testing the optical system for aberrations, adjust and check the uniformity of illumination of the field of view of the optical system in four spectral channels, and perform adjustment and testing of the precision scanning system.