

ПРИБОРОСТРОЕНИЕ ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

УДК 543.426;543.9

EDN: QJKEOA

© В. Е. Курочкин, Ф. Л. Владимиров, А. С. Альдекеева, Н. А. Корнева, 2025

К ВОПРОСУ ОБ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА

В статье рассмотрено влияние отражения и рассеяния излучения флуоресценции в линейке капилляров на аналитическую чувствительность генетического анализатора. Отраженное и рассеянное излучение создает фоновую засветку, которая в ряде случаев может превышать интенсивность информативного сигнала флуоресценции. Показано, что основной вклад в фоновую засветку линейки капилляров вносит отражение излучения от соседних капилляров с высокой концентрацией флуорофоров и, соответственно, высокой интенсивностью флуоресценции. Экспериментальная проверка предложенной модели формирования фоновой засветки была проведена на стандартной линейке капилляров с 8 капиллярами, в которой один из капилляров был заполнен коллоидным раствором квантовых точек. Экспериментально полученные зависимости интенсивности отраженного капиллярами излучения флуоресценции достаточно корректно описываются предложенной моделью. Если интенсивности флуоресценции в различных капиллярах линейки отличаются незначительно, то капилляры не оказывают существенного влияния друг на друга. При разнице интенсивности флуоресценции в 1000 раз, эффективная аналитическая чувствительность падает примерно в 100 раз. Из полученных результатов следует, что для получения высокой аналитической чувствительности геномного секвенирования концентрация флуорофоров должна быть примерно одинаковой во всех капиллярах линейки. Рассматривается целесообразность использования линеек капилляров с большим количеством капилляров и меры по уменьшению взаимного влияния капилляров в линейке капилляров генетического анализатора.

Ключевые слова: аналитическая чувствительность, генетический анализатор, линейка капилляров

ВВЕДЕНИЕ

К основным характеристикам генетических анализаторов [1, 2] относятся длина прочтения, максимальная анализируемая длина, время стандартного фрагментного анализа, количество каналов детекции флуоресценции, аналитическая чувствительность, динамический диапазон измерения сигнала в каждом спектральном диапазоне [3, 4]. Аналитическая чувствительность определяет минимальную концентрацию анализируемых реагентов, таких как флуоресцентно меченые фрагменты ДНК или красители в модельных экспериментах. Высокая чувствительность имеет большое значение, когда исследуются образцы с малым количеством ДНК, которое даже после амплификации с помощью полимеразной цепной реакции позволяет получить интенсивности флуоресценции, близкие к сигналу шумов или фонового излучения [5]. Поэтому исследования, направленные на повышение аналитической чувствительности генетического анализатора и определение ее фактического значения, являются актуальной задачей.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Обычно предполагается, что аналитическая чувствительность определяется шумами измерительного тракта, фоновой засветкой и другими паразитными эффектами.

В работе [6] изучено влияние отраженного одиночным капилляром излучения лазера на чувствительность флуоресцентных измерений. В этой работе делается вывод, что основной вклад в интенсивность фоновой засветки в детекторах для систем капиллярного электрофореза вносит отраженное от капилляра излучение лазера. В работе показано, что для стандартной оптической схемы с нормальным падением лазерного луча на капилляр и при условии, что излучение от капилляра собирается параболическим зеркалом в угле 120° , примерно 4.2% мощности лазерного излучения, падающего на капилляр, перераспределяется на фотоприемное устройство. Световой поток флуоресценции F при тех же условиях равен [6]:

$$F = PKT(1 - 10^{-\varepsilon bC}) \approx PKT\varepsilon bC \times \ln 10, \quad (1)$$

где F — поток флуоресценции; K — квантовый

выход пробы; T — коэффициент пропускания оптической системы; ε — молярный коэффициент экстинкции пробы; b — оптический путь (диаметр капилляра); C — концентрация флуоресцирующего вещества.

Оценки, сделанные по этой формуле при мощности лазерного излучения $P = 30$ мВт, $b = 75$ мкм, $T = 0.5$, $\varepsilon = 200\,000$ л/моль, $K = 0.15$, показывают, что полное излучение флуоресценции во всем телесном угле составляет примерно $F \approx 8 \times |C|$ Вт. Так, при концентрации пробы $C = 10^{-12}$ моль/л поток флуоресценции будет составлять $F = 8 \times 10^{-12}$ Вт. Этот поток равномерно распределен в полном телесном угле 4π . Зеркало при указанных выше параметрах собирает излучение в телесном угле π . Поэтому на фотоприемник попадает примерно 25% полезного сигнала, т.е. $F_{\phi n} = 2 \times 10^{-12}$ Вт. В то же время, при той же мощности лазерного излучения $P = 30$ мВт в сторону фотоприемника отражается примерно $P_{\phi n} = 1.3 \times 10^{-3}$ Вт. Использование интерференционных фильтров позволяет подавить паразитное лазерное излучение, отраженное капилляром, однако при этом снижается пропускание оптического канала, что приводит к снижению чувствительности системы. Для минимизации паразитного лазерного излучения, попадающего на фотоприемник, в работе [6] было предложено использовать пространственное разделение лучей за счет наклонного падения лазерного излучения на капилляр с пробой. Такой подход используется в настоящее время в генетическом анализаторе "НАНОФОР 05".

В ряде работ [7–9] отмечается определяющее влияние шумов фотоприемника на аналитическую чувствительность систем на основе капиллярного электрофореза. Рассматриваются влияния дробового шума, флуктуации светового потока, фильт-

рации сигналов. В работе [10] исследован процесс фотораспада флуоресцина под действием лазерного излучения. Показано, что фотодеградация красителя снижает чувствительность измерений и накладывает ограничения на мощность возбуждающего лазерного излучения. Полученные в [10] результаты позволяют оптимизировать мощность лазера с учетом времени деструкции красителя и времени нахождения молекулы в зоне действия лазерного излучения.

В работе [11] проведена экспериментальная оценка значений аналитической чувствительности измерения сигналов флуоресценции для генетического анализатора "НАНОФОР 05". Оценка проведена для шести спектральных диапазонов, соответствующих флуоресценции наиболее распространенных в практике генетических исследований красителей. При одной и той же концентрации красителей $C = 10^{-9}$ М/л было измерено отношение сигнал/шум S/N для различных красителей. Полученные значения представлены в Табл. 1.

Различные величины сигналов и отношения сигнал/шум для различных красителей обусловлены различиями яркости люминесценции, квантового выхода, поглощения, чувствительности регистрирующей системы в различных спектральных диапазонах. Аналитическую чувствительность C_{np} , — минимальную концентрацию красителя, которую можно зарегистрировать, — определяют следующим образом:

$$C_{np} = C \frac{(S/N)_{np}}{S/N}, \quad (2),$$

где C — концентрация красителей в эксперименте; S/N — измеренное отношение сигнал/шум; $(S/N)_{np}$ — предельное значение отношения сигнал/шум.

Табл. 1. Результаты измерения значений сигнал/шум и аналитической чувствительности C_{np} для генетических анализаторов "НАНОФОР 05" с использованием растворов красителей с концентрацией $C = 10^{-9}$ М/л

Краситель	6FAM	5R6G	6TAMRA	6ROX	6Sy630	Sy660
Длина волны излучения, нм	520	550	580	610	626	658
S/N	109	129	54	19	14	27
$C_{np} \times 10^{-10}$, М/л	0.28	0.23	0.56	1.58	2.14	1.11

Для надежной регистрации обычно за предельное значение величины сигнал/шум принимается значение $(S/N)_{np} = 3$. Величины аналитической чувствительности, рассчитанные для этого значения отношения сигнал/шум, приведены в табл. 1 и варьируются от 0.23 до 2.14 М/л для различных красителей. Измерения на генетическом анализаторе "НАНОФОР 05" проводились в восьми капиллярах одновременно с одной и той же концентрацией красителей $C = 10^{-9}$ М/л.

Полученные в работе [11] экспериментальные значения объясняются теоретической зависимостью интенсивности флуоресценции I от параметров вещества, полученной ранее в работе [6]:

$$I = \eta_{\lambda} \Delta I_e = \eta_{\lambda} I_e k_{\lambda} \rho l, \quad (3)$$

где η_{λ} — квантовый выход флуоресценции; $\Delta I_e = I_e k_{\lambda} \rho l$ — количество излучения, поглощенного в веществе; k_{λ} — коэффициент поглощения; ρ — плотность флуоресцирующего вещества; l — длина оптического пути (диаметр капилляра).

Различия в аналитической чувствительности для различных флуорофоров объясняются также тем, что для возбуждения флуоресценции использовалась одна и та же длина волны $\lambda_e = 488$ нм, которая не совпадала с максимумами поглощения различных флуорофоров.

ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛИ

В настоящей работе рассматривается взаимное влияние соседних капилляров в линейке капилляров генетического анализатора "НАНОФОР 05" за счет различных механизмов перераспределения световых потоков.

Рассмотрим фрагмент капиллярной линейки в регистрирующей системе генетического анализатора "НАНОФОР 05" (рис. 1).

На рис. 1 показаны два соседних капилляра 1 и 2, на которые падает возбуждающее лазерное излучение I_e . В капиллярах возникают сигналы флуоресценции I_1 и I_2 . Излучение от капилляров попадает на камеру через объектив в пределах числовой апертуры. Рассмотрим величину фоновой засветки второго капилляра, которая обусловлена излучением первого капилляра, и ее влияние на аналитическую чувствительность системы регистрации.

Оценки будем производить в двумерной модели распространения света. Телесные углы заменим углами на плоскости, поскольку в генетическом анализаторе для возбуждения флуоресценции используется узкий лазерный пучок шириной примерно 40 мкм. Отражение и рассеяние излучения флуоресценции будет происходить в пределах

этой узкой полосы. Будем считать, что излучение флуоресценции распространяется в угле 2π в плоскости, перпендикулярной направлению капилляров в линейке капилляров. Такой подход упрощает расчеты фоновой засветки и позволяет качественно оценить взаимное влияние излучения соседних капилляров в линейке капилляров.

Если полное излучение второго капилляра, для которого производится оценка аналитической чувствительности, составляет I_2 , то в рамках двумерной модели в объектив системы регистрации попадает полезный сигнал I_{c2} :

$$I_{c2} = I_2 \frac{\beta}{2\pi}, \quad (4)$$

где $\beta = 2 \arctg \frac{D}{2H}$, D — диаметр входного зрачка объектива; H — расстояние между капиллярной линейкой и входным зрачком объектива.

От первого капилляра в объектив будет попадать излучение

$$I_{c1} = I_1 \frac{\beta}{2\pi}, \quad (5)$$

где I_1 — полное излучение от первого капилляра.

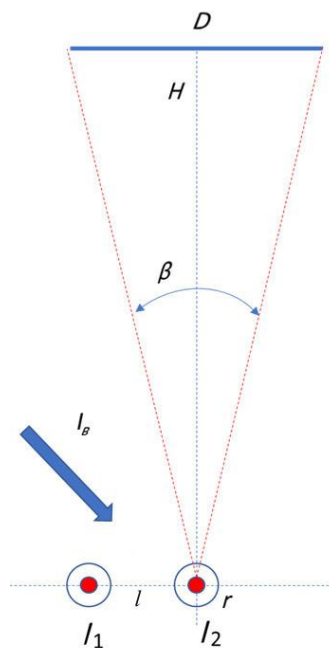


Рис. 1. Фрагмент капиллярной линейки в регистрирующей системе генетического анализатора "НАНОФОР 05".

D — диаметр входного зрачка объектива, H — расстояние между капиллярной линейкой и входным зрачком объектива, l — расстояние между капиллярами

На второй капилляр будет падать излучение флуоресценции со стороны первого капилляра в пределах угла:

$$\alpha = 2 \operatorname{arctg} \frac{r}{l}, \quad (6)$$

где r — радиус капилляра; l — расстояние между капиллярами.

Поскольку излучение от первого капилляра распространяется равномерно во все стороны, то на второй капилляр будет попадать излучение

$$I = I_1 \frac{\alpha}{2\pi}. \quad (7)$$

Часть этого излучения отразится от поверхности капилляра I_{omp} и рассеется на различных дефектах капилляра I_{pac} .

Кроме этого, от второго капилляра отразится $I_{в.omp}$ и рассеется на дефектах $I_{в.pac}$ — часть возбуждающего излучения $I_{в.}$. Также возможна флуоресценция различных загрязнений капилляра под действием возбуждающего излучения $I_{в.ф.}$. Эти паразитные излучения будут попадать в объектив регистрирующей системы, создавая фоновую засветку:

$$I_{\phi} = I_{omp} + I_{pac} + I_{в.omp} + I_{в.pac} + I_{в.ф.} \quad (8)$$

Рассмотрим влияние этих факторов на фоновую засветку.

Основная часть отраженного от капилляра света формируется на внешней границе капилляра, как это показано на рис. 2.

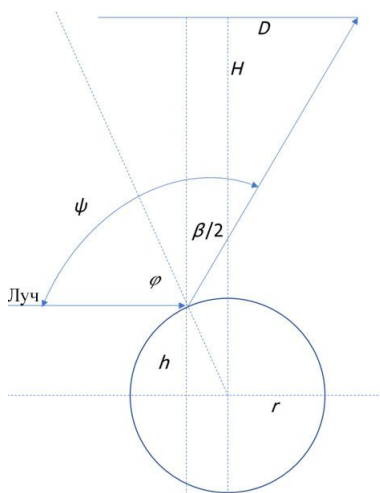


Рис. 2. Отражение света на внешней поверхности капилляра.

D — диаметр входного зрачка объектива, H — расстояние между капиллярной линейкой и входным зрачком объектива, r — радиус капилляра

АНАЛИЗ ИНТЕНСИВНОСТИ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ФОНОВУЮ ЗАСВЕТКУ

Падающий на капилляр луч под углом φ к нормали поверхности капилляра с радиусом r отражается под тем же самым углом и попадает во входной зрачок объектива системы регистрации. В объектив регистрирующей системы будут попадать лучи от соседнего капилляра при условии:

$$\Delta h = h_2 - h_1 = 2r \sin \frac{\beta}{2} \cos \frac{\pi}{4}, \quad (9)$$

где

$$h_1 = r \sin \left(\frac{\pi}{4} - \frac{\beta}{2} \right),$$

$$h_2 = r \sin \left(\frac{\pi}{4} + \frac{\beta}{2} \right).$$

Этому интервалу Δh будет соответствовать угол

$$\theta = \operatorname{arctg} \frac{h_1 - h_2}{l}. \quad (10)$$

При интенсивности флуоресценции в первом и втором капиллярах I_1 и I_2 полезные сигналы, попавшие в объектив регистрирующей системы от этих капилляров, будут равны

$$I_{c1} = I_1 \frac{\beta}{2\pi}, \quad (11)$$

$$I_{c2} = I_2 \frac{\beta}{2\pi}. \quad (12)$$

Величина излучения от первого капилляра, попавшего в результате отражения от второго капилляра в объектив регистрирующей системы, будет равна

$$\begin{aligned} I_{\phi 2} &= \frac{\theta}{2\pi} I_1 R = \\ &= \frac{I_1}{2\pi} R \times \operatorname{arctg} \left[\frac{r}{l} \left(2 \cos \frac{\pi}{4} \sin \frac{\beta}{2} \right) \right], \end{aligned} \quad (13)$$

где l — расстояние между капиллярами, R — коэффициент отражения излучения при углах, близких к $\pi/4$.

Следует отметить, что излучение от соседнего капилляра будет отражаться не только от наружной границы капилляра, но и от его внутренней поверхности при условии заполнения капилляра гелем, показатель преломления которого примерно равен показателю преломления кварцевого капилляра. Примерный ход лучей в этом случае показан на рис. 3.

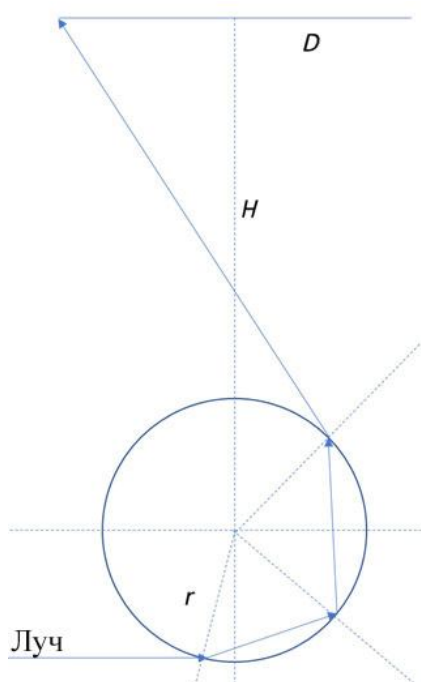


Рис. 3. Ход лучей, отраженных от внутренней поверхности капилляра.

D — диаметр входного зрачка объектива, H — расстояние между капиллярной линией и входным зрачком объектива, r — радиус капилляра

Оценки, выполненные для этого случая, показывают, что диапазон высот Δh будет значительно меньше, угол падения света на капилляр близок к скользящему, поэтому коэффициент отражения от внутренней поверхности капилляра значительно меньше, чем в случае отражения от внешней поверхности, поэтому отражение от внутренних поверхностей в оценочных расчетах учитывать не будем.

Относительная интенсивность отраженного излучения по отношению к полезному сигналу первого капилляра будет равна:

$$\gamma_o = \frac{I_{\phi 2}}{I_{c1}} = \frac{1}{\beta} \arctg \left(\frac{2r}{l} \cos \frac{\pi}{4} \sin \frac{\beta}{2} \right) \times R. \quad (14)$$

Также можно оценить влияние отражения излучения от капилляров, оценивая величину отношения сигнал/фон

$$\delta_o = \frac{I_{c2}}{I_{\phi 2}} =$$

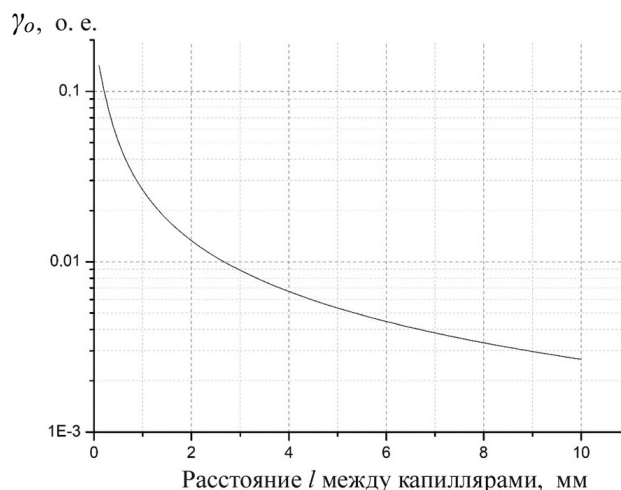


Рис. 4. Зависимость относительной интенсивности отраженного излучения γ_o от расстояния между капиллярами l .

$$= \frac{I_2}{I_1} \times \frac{1}{R} \times \frac{\beta}{\arctg \left[\frac{r}{l} \left(2 \cos \frac{\pi}{4} \sin \frac{\beta}{2} \right) \right]}. \quad (15)$$

При типичных значениях параметров оптической системы геномного секвенатора ($D = 10$ мм, $H = 50$ мм, $r = 0.09$ мм) величина Δh — диапазон высот от середины капилляра, при попадании в который отраженные лучи попадают в объектив регистрирующей системы, — будет составлять $\Delta h = 0.00634$ мм, а угол $\beta/2$ будет равен

$$\frac{\beta}{2} = \arctg \frac{D}{2H} = 0.1 \text{ рад}. \quad (16)$$

По формулам Френеля можно оценить величину коэффициента отражения света для кварцевого капилляра ($n = 1.46$) при углах падения вблизи угла $\pi/4$. Для s -составляющей коэффициент отражения будет примерно равен $R_s = 0.1$ и для p -составляющей $R_p = 0$. Средний коэффициент отражения будет равен: $R = 0.05$.

Зависимость относительной интенсивности отраженного излучения, рассчитанная по формуле (14) для указанных параметров, показана на рис. 4.

Зависимость отношения сигнал/фон для различных значений отношения интенсивностей флуоресценции в первом и втором капиллярах

$k = \frac{I_2}{I_1}$, рассчитанная по формуле (15), показана на рис. 5.

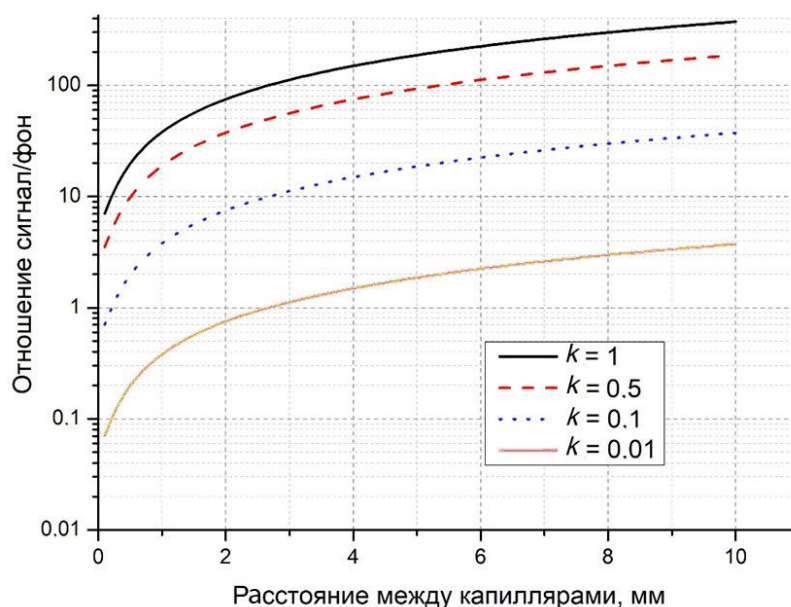


Рис. 5. Зависимость отношения сигнал/фон для различных значений отношения интенсивностей флуоресценции k первом и втором капиллярах.

При небольших расстояниях между капиллярами значительная часть излучения флуоресценции в одном из капилляров отражается соседними капиллярами. Сделанные оценки показывают, что на расстоянии 1–2 мм капилляр отражает в систему регистрации более 1% полезного сигнала в первом капилляре. Отражение излучения флуоресценции будет приводить к уменьшению отношения сигнал/фон δ . Из рис. 5 видно, что при $k = 1$, т.е. при одинаковой интенсивности флуоресценции в соседних капиллярах, паразитное отражение от соседних капилляров не оказывает существенного влияния на величину δ . При увеличении интенсивности флуоресценции в одном из капилляров в 10 раз по отношению к соседним капиллярам ($k = 0.1$) величина отношения сигнал/фон будет меньше 3 на расстоянии до $l = 1$ мм. Увеличение интенсивности флуоресценции в одном из капилляров в 100 раз ($k = 0.01$) приводит к невозможности проведения измерений в линейке капилляров.

Другим фактором, влияющим на фоновую засветку, является рассеяние света на различных неоднородностях, загрязнениях, остатках полиимидной оболочки и т.п. Величина рассеяния характеризуется коэффициентом рассеяния ξ :

$$\xi = \frac{I_4}{I_3}, \quad (17)$$

где $I_3 = \frac{I_1}{\pi} \arctg \frac{r}{l}$ — излучение, падающее на ка-

пилляр 2 со стороны капилляра 1; I_4 — излучение, рассеянное капилляром 2.

Коэффициент рассеяния является технологическим параметром, поскольку определяется количеством дефектов, качеством очистки капилляра, загрязнениями как внутри капилляра, так и снаружи. По экспериментальным данным, коэффициент рассеяния может варьироваться в широких пределах $\xi = 0.01$ – 0.0001 .

Поскольку излучение рассеивается капилляром во все стороны равномерно, то в объектив регистрирующей системы будет попадать рассеянное излучение I_{p2} в пределах угла $\beta = 2 \arctg \frac{D}{2H}$:

$$I_{p2} = \frac{I_1}{\pi^2} \xi \times \arctg \frac{r}{l} \times \arctg \frac{D}{2H}. \quad (18)$$

Относительная интенсивность рассеянного излучения по отношению к полезному сигналу первого капилляра будет равна

$$\gamma_p = \frac{\xi}{\pi} \arctg \frac{r}{l}. \quad (19)$$

А отношение сигнал/фон, обусловленное рассеянием света на технологических дефектах, будет равно

$$\delta_p = \frac{I_{c2}}{I_{p2}} \approx \frac{I_2}{I_1} \frac{\pi l H}{\xi r D}. \quad (20)$$

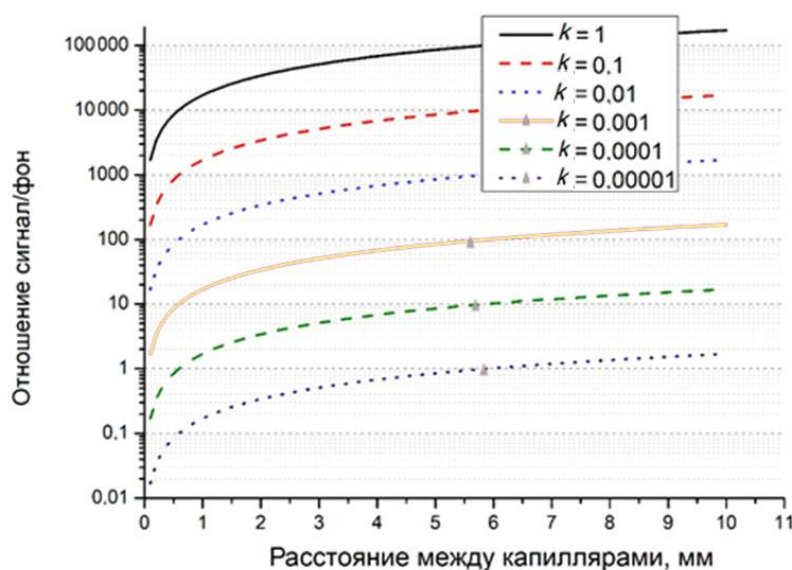


Рис. 6. Зависимость отношения сигнал/фон от расстояния между капиллярами для различных значений k относительной интенсивности излучения флуоресценции во втором капилляре. Коэффициент рассеяния второго капилляра $\zeta = 0.01$

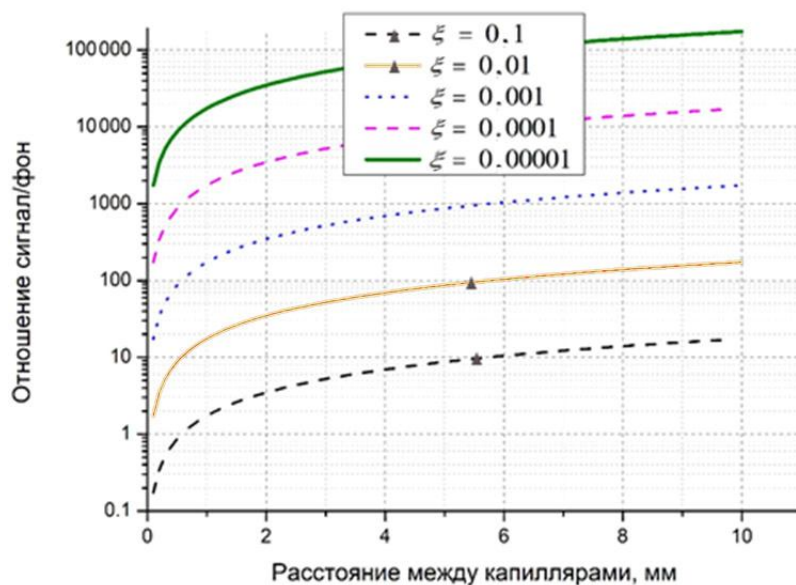


Рис. 7. Зависимость отношения сигнал/фон от расстояния l между капиллярами для различных значений ζ коэффициента рассеяния второго капилляра. Относительная интенсивность сигнала во втором капилляре $k = 0.001$

Зависимости отношения сигнал/фон от расстояния между капиллярами для различных значений коэффициента рассеяния ζ и относительной интенсивности излучения флуоресценции во втором капилляре $k = \frac{I_2}{I_1}$, рассчитанные по формуле

(20), представлены на рис. 6, 7. Из рис. 6 и 7 видно, что рассеяние излучения от соседних капилляров начинает играть заметную роль при больших значениях коэффициента рассеяния $\zeta > 0.01$ и при большой разнице интенсивности излучения флуоресценции соседних капилляров $k < 0.001$.

При отсутствии в линейке капилляров заметных технологических дефектов, влиянием рассеяния на фоновую засветку можно пренебречь, поскольку $R \gg \xi$:

$$\frac{\gamma_o}{\gamma_p} = \frac{R}{\xi} \times 0.71\pi, \quad (21)$$

где γ_o — относительная интенсивность отраженного излучения по отношению к полезному сигналу первого капилляра; γ_p — относительная интенсивность рассеянного излучения по отношению к полезному сигналу первого капилляра; R — коэффициент отражения капилляра; ξ — коэффициент рассеяния капилляра.

Возбуждающее лазерное излучение при определенных условиях также может вносить свой вклад в фоновую засветку. В регистрирующую систему может попадать рассеянное возбуждающее излучение и паразитное излучение флуоресценции, возникающее на различных дефектах и загрязнениях. Для минимизации возбуждающего лазерного излучения, попадающего в систему регистрации, используются интерференционные фильтры с высоким поглощением на длине волны возбуждающего излучения λ . Если интенсивность возбуждающего излучения — I_λ , то интенсивность рассеянного капилляром излучения $I_{p\lambda}$ можно записать следующим образом:

$$I_{p\lambda} = I_\lambda \cdot \xi_\lambda \times 10^{-D_\lambda}, \quad (22)$$

где ξ_λ — коэффициент рассеяния возбуждающего излучения; D_λ — оптическая плотность фильтра на длине волны возбуждающего излучения, установленного в системе регистрации.

Полезный сигнал флуоресценции в соответствии с (3) равен

$$I_{c2} = \eta_\lambda \times \Delta I = I_e \cdot \eta_\lambda \cdot k_\lambda \cdot \rho \cdot l, \quad (23)$$

где η_λ — квантовый выход флуоресценции; $\Delta I_e = I_e k_\lambda \rho l$ — количество излучения, поглощенного в веществе; k_λ — коэффициент поглощения; ρ — плотность флуоресцирующего вещества; l — длина оптического пути (диаметр капилляра).

Отношение сигнал/фон, обусловленное рассеянием лазерного возбуждающего излучения на технологических дефектах, будет равно

$$\delta_{p\lambda} = \frac{I_{c2}}{I_{p\lambda}} = \frac{\eta_\lambda k_\lambda \rho l}{\xi_\lambda \times 10^{-D_\lambda}} = \frac{\eta_\lambda k_\lambda}{\xi_\lambda} \rho \cdot l \times 10^{D_\lambda}. \quad (24)$$

Численные оценки, сделанные при типичных значениях $D_\lambda = 6.0$, $\xi_\lambda = 10^{-4}$, показывают, что

отношение сигнал/фон, обусловленное рассеянием лазерного излучения, достаточно высокое — более 10^{10} и не оказывает заметного влияния на аналитическую чувствительность.

Возбуждающее лазерное излучение также может вызывать флуоресценцию центров поглощения. Интенсивность флуоресценции в этом случае можно записать следующим образом:

$$I_{\phi\lambda} = I_e \cdot \eta_2 \cdot k_2 \cdot \rho_2 \cdot l, \quad (25)$$

где η_2 — средний квантовый выход флуоресценции дефектов; k_2 — коэффициент поглощения лазерного излучения на дефектах; ρ_2 — концентрация дефектов.

Отношение сигнал/фон, обусловленное флуоресценцией дефектов на капилляре под действием лазерного возбуждающего излучения, равно

$$\delta_{\phi2} = \frac{I_{c2}}{I_{\phi2}} = \frac{\eta_\lambda k_\lambda \rho}{\eta_2 k_2 \rho_2}. \quad (26)$$

Из этой формулы следует, что даже при $\frac{\eta_\lambda}{\eta_2} = 1$, $\frac{k_\lambda}{k_2} = 1$ флуоресценция на технологических дефектах будет играть заметную роль, если концентрация дефектов будет сопоставима с концентрацией флуорофора в капилляре. Численные оценки показывают, что концентрация дефектов, при которой флуоресценция на них будет играть заметную роль, составляет примерно $\rho_2 = 10^3$ дефектов на отрезок капилляра длиной 50 мкм. Обычно концентрация технологических дефектов значительно меньше, поэтому этот фактор не оказывает заметного влияния на результирующее отношение сигнал/фон.

Таким образом, основной вклад в фоновую засветку линейки капилляров вносит отражение излучения от соседних капилляров с высокой концентрацией флуорофоров и, соответственно, высокой интенсивностью флуоресценции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА МОДЕЛЬНЫХ ОЦЕНОК

Экспериментальная проверка рассмотренной модели формирования фоновой засветки была проведена на стандартной линейке капилляров с 8 капиллярами. Один из капилляров был заполнен 2% коллоидным раствором на основе квантовых точек CdS/ZnS (KT-620) и фотополимера. Другие капилляры были заполнены водой. После заполнения капилляра композицией фотополимер с квантовыми точками полимеризовался при помощи УФ-осветителя с длиной волны излучения $\lambda = 365$ нм

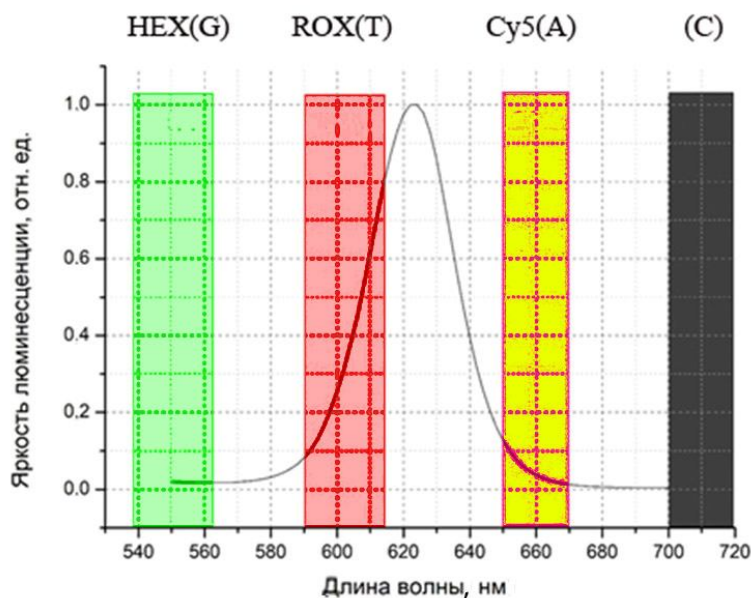


Рис. 8. Спектр люминесценции композиции с квантовыми точками КТ-620 и спектральные области флуоресценции стандартных красителей, используемых для генетических анализов.

и мощностью 3.0 Вт. Спектр люминесценции используемых квантовых точек показан на рис. 8.

Спектр люминесценции имеет максимум в районе 620 нм, полуширина спектра — примерно 30 нм. Для возбуждения использовалась длина волны 400 нм. Спектр люминесценции измерялся на спектрофлуориметре HITACHI F4010. На графике показаны спектральные области флуоресценции стандартных красителей, используемых для генетических анализов.

Использование квантовых точек вместо органических красителей было обусловлено их уникальными свойствами. Эти материалы обладают высокой яркостью флуоресценции, что определяется высокими значениями коэффициента экстинкции и квантового выхода люминесценции. Квантовые точки имеют широкую полосу возбуждения, что позволяет использовать один источник возбуждающего излучения, например, в диапазоне 400–500 нм для возбуждения люминесценции квантовых точек с различными спектрами люминесценции. Люминофоры на основе квантовых точек являются неорганическими материалами и обладают высокой фотостабильностью, что позволяет использовать мощное лазерное излучение для возбуждения люминесценции без риска деградации и выгорания люминофора. Квантовые точки имеют весьма узкий и симметричный пик флюо-

ресценции без длинноволновых хвостов и других особенностей. Положение максимума флуоресценции определяется размером квантовых точек и может варьироваться в широких пределах.

Изображение линейки капилляров, в которой один капилляр заполнен квантовыми точками (справа, 1), показано на рис. 9. Остальные семь капилляров заполнены водой и не люминесцируют. Соседние капилляры отражают заметную часть излучения люминесценции от первого капилляра.

Для регистрации изображения линейки капилляров использовался бинокулярный микроскоп с цветной видеокамерой (5.0 Мп), диаметр входного зрачка объектива составлял $D = 54$ мм, рабочее расстояние $H = 70$ мм. Люминесценция в капилляре возбуждалась светодиодным источником с длиной волны излучения 365 нм. В канале регистрации устанавливался светофильтр, блокирующий ультрафиолетовое излучение. В полученном изображении измерялась яркость светлых полос I_i и их ширина Δh_i . Интенсивность отраженного излучения оценивалась, как

$$E_i = I_i \times \Delta h_i. \quad (27)$$

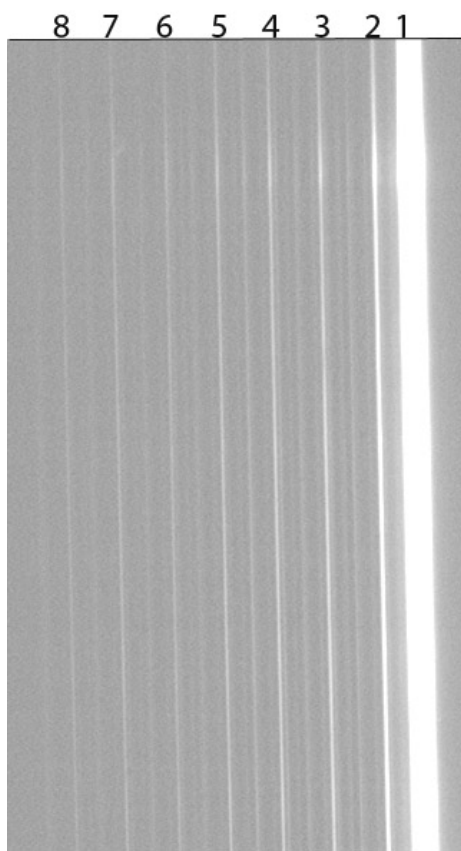


Рис. 9. Линейка из 8 капилляров. Капилляр 1 заполнен квантовыми точками (справа). Остальные капилляры отражают заметную часть излучения люминесценции первого капилляра

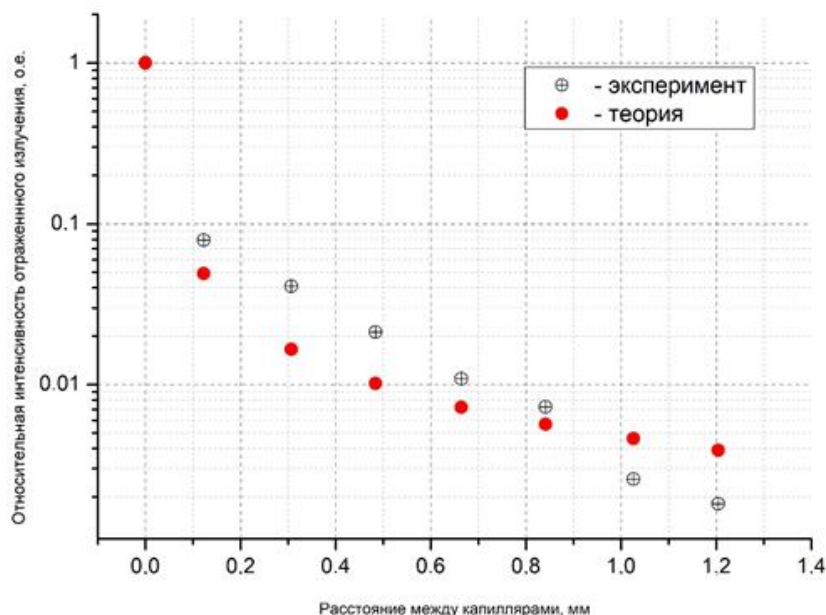


Рис. 10. Экспериментально полученная зависимость интенсивности отраженного излучения от расстояния между капиллярами в сопоставлении с теоретической зависимостью (14).

Экспериментально полученная зависимость интенсивности отраженного излучения от расстояния между капиллярами в сопоставлении с теоретической зависимостью, рассчитанной по формуле (14) и учитывающей только отражение от капилляров, представлена на рис. 10.

Расчеты по формуле (14) проводились при следующих параметрах: $D = 54$ мм, $H = 70$ мм, $R = 0.07$, $\beta = 0.736$ рад, $r = 0.09$ мм. Экспериментальные и рассчитанные зависимости нормировались к излучению первого капилляра, заполненного квантовыми точками. В целом экспериментально полученная зависимость интенсивности отраженного излучения достаточно корректно описывается теоретической зависимостью. Уменьшение отраженного сигнала на больших расстояниях от люминесцирующего капилляра объясняется тем, что на эти капилляры попадает меньше излучения люминесценции из-за блокирования излучения близлежащими капиллярами. Увеличенные значе-

ния относительной интенсивности отраженного излучения по сравнению с теоретической зависимостью при малых расстояниях, по-видимому, обусловлены вкладом рассеянного излучения, поскольку в модельном эксперименте линейка капилляров освещалась широким пучком возбуждающего излучения. Поэтому интенсивность излучения, падающего на второй капилляр и подвергающегося рассеянию, была значительно больше по сравнению со случаем отражения излучения, которое происходит практически в одной плоскости. Следует отметить, что в генетическом анализаторе как отражение, так и рассеяние происходят в одной плоскости, и теоретические зависимости будут корректно описывать фоновую засветку.

Поскольку излучение флуоресценции отдельного капилляра пропорционально концентрации флуорофора в этом капилляре, то для эффективной аналитической чувствительности $S_{эф}$ и относительной аналитической чувствительности

$\chi = \frac{C}{C_{np}}$ с учетом (15) можно записать

$$C_{эф} = \left(1 + 0.0089 \times \frac{\delta_o \cdot p}{l} \right) C_{np}, \quad (28)$$

$$\chi = \frac{C_{эф}}{C_{np}} = 1 + 0.0089 \times \frac{\delta_o \cdot p}{l}, \quad (29)$$

где C_{np} — предельная аналитическая чувствительность в случае, когда концентрация флуорофора

во всех капиллярах линейки одна и та же ($p = 1$);

$p = \frac{I_1}{I_2} = \frac{C_1}{C_2}$ — отношение интенсивностей люми-

несценции в первом и втором капиллярах; C_1, C_2 — концентрации флуорофоров в первом и втором капиллярах.

Зависимость относительной аналитической чувствительности от расстояния между капиллярами для различных значений отношения p интенсивностей люминесценции в первом и втором капиллярах представлена на рис. 11.

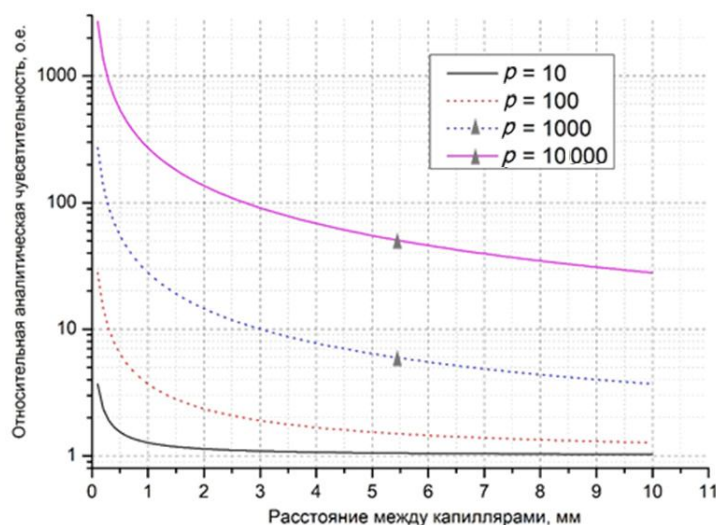


Рис. 11. Зависимость относительной аналитической чувствительности от расстояния между капиллярами для различных значений $p = 10; 100; 1000; 10000$.

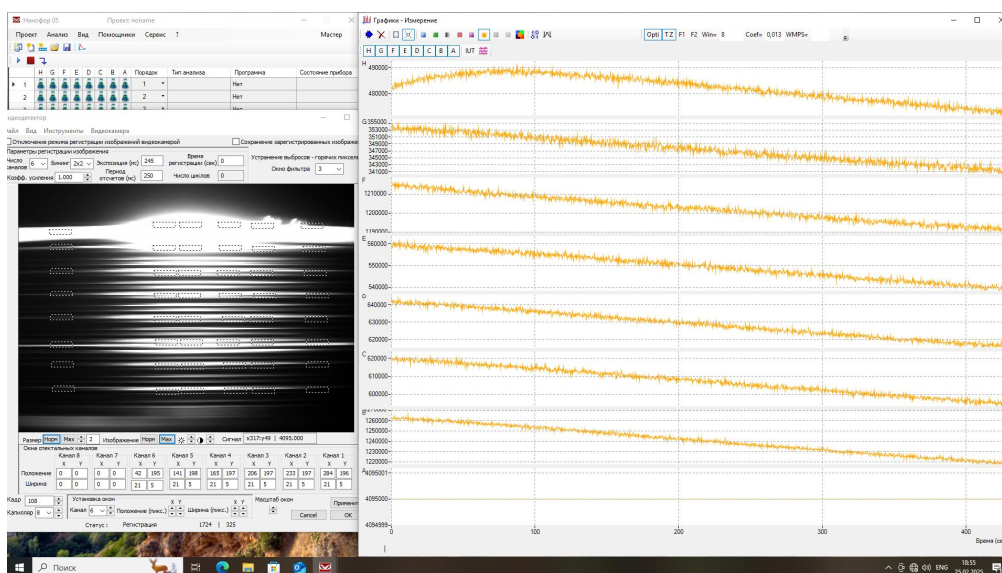


Рис. 12. Скрин-шот экрана программы управления прибора "НАНОФОР 05".

Из зависимости (29) и рис. 11 следует, что, если интенсивности люминесценции в различных капиллярах линейки отличаются незначительно ($p \sim 1$), то капилляры не оказывают существенного влияния друг на друга. При $p = 10$ эффективная аналитическая чувствительность уменьшается примерно в 2 раза в соседнем капилляре. При $p = 100$ эффективная аналитическая чувствительность уменьшается в 3–11 раз в пределах линейки капилляров. При $p = 1000$ эффективная аналитическая чувствительность падает примерно в 30–110 раз и составляет примерно 3×10^{-9} – 1.1×10^{-8} М/л. При $p = 10\,000$ эффективная аналитическая чувствительность падает более чем в 1000 раз (10^{-7} М/л).

Проверка влияния интенсивного излучения флуоресценции одного из капилляров на соседние капилляры линейки проводилась также в приборе "НАНОФОР 05". Линейка капилляров, в которой один из капилляров был заполнен квантовыми точками, помещалась вместо стандартной линейки капилляров. Засветка и считывание производились в стандартном режиме. Скрин-шот экрана программы управления показан на рис. 12.

Высокоинтенсивная флуоресценция в одном из капилляров создает заметную фоновую засветку практически во всех капиллярах линейки и делает невозможным проведение корректных измерений.

Из полученных результатов следует, что для получения высокой аналитической чувствительности концентрация флуорофора должна быть примерно одинаковой во всех капиллярах линейки. Для реализации высокой чувствительности генетического анализатора использование линеек капилляров с большим количеством капилляров не имеет большого смысла. Для уменьшения взаимного влияния капилляров можно существенно увеличить расстояние между капиллярами.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в работе рассмотрено влияние отражения и рассеяния излучения флуоресценции соседними капиллярами в линейке капилляров на аналитическую чувствительность генетического анализатора. Отраженное и рассеянное излучения создают дополнительную фоновую засветку, которая в ряде случаев может превышать информативный сигнал флуоресценции. Теоретически показано и экспериментально подтверждено, что основной вклад в фоновую засветку линейки ка-

пилляров вносит отражение излучения от соседних капилляров с высокой концентрацией флуорофоров и, соответственно, высокой интенсивностью флуоресценции. Экспериментальная проверка предложенной модели формирования фоновой засветки была проведена на стандартной линейке капилляров с 8 капиллярами, в которой один из капилляров был заполнен коллоидным раствором на основе квантовых точек и фотополимера. Экспериментально полученные зависимости интенсивности отраженного излучения достаточно корректно описываются двумерной моделью оптической системы. Если интенсивности люминесценции в различных капиллярах линейки отличаются незначительно, то капилляры не оказывают заметного влияния друг на друга. При разнице интенсивности флуоресценции в 1000 раз эффективная аналитическая чувствительность падает примерно в 100 раз. Из полученных результатов следует, что для получения высокой аналитической чувствительности концентрация флуорофора должна быть примерно одинаковой во всех капиллярах линейки. При использовании линеек капилляров с большим количеством капилляров следует учитывать их взаимное влияние — отражение излучения флуоресценции как с различной интенсивностью, так и различным спектральным составом.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Курочкин В.Е., Алексеев Я.И., Петров Д.Г., Евстапов А.А. Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа: разработки ИАП РАН и ООО "Синтол" // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2021. Т. 40, № 3. С. 69–74. DOI: 10.17816/tmmar76918
2. Волков А.А., Волков И.А., Плугов А.Г., Кулябина Е.В., Мелкова О.Н., Лавров Г.С., Бочарова Д.В., Алексеев Я.И. Генетический анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК // Измерительная техника. 2021. № 1. С. 60–65. DOI: 10.32446/0368-1025it.2021-1-60-65
3. НАНОФОР 05 Методические рекомендации. [Электронный ресурс]. URL: https://www.syntol.ru/docs/Методические_рекомендации/
4. Бородинов А.Г., Манойлов В.В., Заруцкий И.В., Петров А.И., Курочкин В.Е. Поколения методов секвенирования ДНК (обзор) // Научное приборостроение. 2020. Т. 30, № 4. С. 3–20. URL: <http://iairas.ru/mag/2020/full4/Art1.pdf>

5. Бочарова Д.В., Меркурьев А.В., Белов Д.А., Лавров Г.С., Курочкин В.Е. Изучение аналитической чувствительности измерения интенсивности флуоресценции в генетическом анализаторе НАНОФОР 05 // Приборостроение-2023: материалы 16-й Международной научно-технической конференции, 15–17 ноября 2023 г., Минск, Республика Беларусь / редкол.: О.К. Гусев (пред.) [и др.]. Минск: БНТУ, 2023. С. 2–27. URL: <https://rep.bntu.by/handle/data/137744?show=full>
6. Беленький Б.Г., Евстапов А.А., Козулин Р.А. Влияние отраженного капилляром излучения лазера на чувствительность флуориметра капиллярного электрофореза // Научное приборостроение. 2001. Т. 11, № 2. С. 21–25. URL: <http://iairas.ru/mag/2001/full2/Art2.pdf>
7. Беленький Б.Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез. СПб.: Наука, 2009. 320 с.
8. Белов Ю.В., Курочкин В.Е., Суханов В.Л. Спектрофотометрический детектор для приборов капиллярного электрофореза // Научное приборостроение. 2009. Т. 19, № 2. С. 47–51. URL: <http://iairas.ru/mag/2009/full2/Art5.pdf>
9. Белов Д.А., Белов Ю.В., Манойлов В.В., Курочкин В.Е. Способы обработки результатов генетических анализов // Научное приборостроение. 2014. Т. 24, № 3. С. 87–91. URL: <http://iairas.ru/mag/2014/full3/Art11.pdf>
10. Козулин Р.А. Оптимизация высокочувствительного лазерного флуоресцентного метода // Оптический журнал. 2008. Т. 75, № 5. С. 3–7. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=10293608>
11. Козлова П.А., Чубинский-Надеждин И.В., Куликов Ю.В., Курочкин В.Е., Новиков Д.О., Алексеев Я.И. Изучение аналитической чувствительности детекто-

ров лазер-индуцированной флуоресценции капиллярных генетических анализаторов // Тезисы докладов Третьей ежегодной всероссийской молодежной конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов "АналитБиоПрибор-2024". СПб: Издательско-полиграфическая ассоциация высших учебных заведений, 2024. С. 108–111. URL: <https://analytbiopribor.ru/%D0%A1%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D1%82%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%B2%20%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D0%BB%D0%B0%D0%B4%D0%BE%D0%B2.pdf>

**Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург, Российская Федерация**

Контакты: Владимир Фёдор Львович,
fedor.vlv3008@gmail.com

Материал поступил в редакцию 01.08.2025

CONCERNING ANALYTICAL SENSITIVITY OF A GENETIC ANALYZER

V. E. Kurochkin, F. L. Vladimirov, A. S. Aldekeyeva, N. A. Korneva

Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

The article considers the effect of reflection and scattering of fluorescence radiation in a capillary array on the analytical sensitivity of a genetic analyzer. Reflected and scattered radiation creates background illumination, which in some cases can exceed the intensity of the informative fluorescence signal. It is shown that the main contribution to the background illumination of a capillary array is made by reflection of radiation from neighboring capillaries with a high concentration of fluorophores and, accordingly, high fluorescence intensity. An experimental test of the proposed model for the formation of background illumination was carried out on a standard capillary array with 8 capillaries, in which one of the capillaries was filled with a colloidal solution of quantum dots. The experimentally obtained dependences of the intensity of fluorescence radiation reflected by the capillaries are quite correctly described by the proposed model. If the fluorescence intensity in different capillaries of the array differs insignificantly, then the capillaries do not have a significant effect on each other. With a 1000-fold difference in fluorescence intensity, the effective analytical sensitivity drops approximately 100 times. The results show that to achieve high analytical sensitivity in genomic sequencing, the fluorophore concentration should be approximately the same in all capillaries in the array. The feasibility of using arrays of

capillaries with a large number of capillaries and measures to reduce the mutual influence of capillaries in the array of capillaries in the genetic analyzer are discussed.

Keywords: concentration sensitivity, genetic analyzer, capillary array

REFERENCES

1. Kurochkin V.E., Alekseev Y.I., Petrov D.G., Evstrapov A.A. [Domestic devices for molecular genetic analysis: developments of the IAP RAS and SINTOL LLC]. *Izvestiya Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii* [Russian Military Medical Academy Reports], 2021, vol. 40, no. 3, pp. 69–74. DOI: 10.17816/rmmar76918 (In Russ.).
2. Volkov A.A., Volkov I.A., Plugov A.G., Kulyabina E.V., Melkova O.N., Lavrov G.S., Bocharova D.V., Alekseev Y.I. [Genetic analyzer Nanophore 05 as a measuring instrument for DNA sequencing]. *Izmeritel'naya Tekhnika* [Measuring technology], 2021, no. 1, pp. 60–65. DOI: 10.32446/0368-1025it.2021-1-60-65 (In Russ.).
3. SINTOL. Nauchno-proizvodstvennaya kompaniya. *NANOFOR 05. Metodicheskie rekomendatsii* [NANOFOR 05. Methodical recommendations]. (In Russ.). URL: https://www.syntol.ru/docs/Методические_рекомендации/
4. Borodinov A.G., Manoilov V.V., Zarutsky I.V., Petrov A.I., Kurochkin V.E. [Generations of DNA sequencing methods (review)]. *Nauchnoe Priborostroyeniye* [Scientific Instrumentation], 2020, vol. 30, no. 4, pp. 3–20. URL: <http://iairas.ru/mag/2020/full4/Art1.pdf> (In Russ.).
5. Bocharova D.V., Merkuriev A.V., Belov D.A., Lavrov G.S., Kurochkin V.E. [Study of analytical sensitivity of fluorescence intensity measurement in the NANOFOR 05 genetic analyzer]. Gusev O.K., et al editors. *Priborostroyeniye-2023: materialy 16-i Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii* [Proc. 16 Int. Sci. Tech. Conf. "Instrumentation-23"], 15–17 Nov 2023, Minsk, BNTU, 2023, pp. 2–27. (In Russ.). URL: <https://rep.bntu.by/handle/data/137744?show=full>
6. Belenkii B.G., Evstrapov A.A., Kozulin R.A. [Influence of laser radiation reflected from the capillary on the Fluorimeter sensitivity in capillary electrophoresis]. *Nauchnoe Priborostroyeniye* [Scientific Instrumentation], 2001, vol. 11, no. 2, pp. 21–25. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/mag/2001/full2/Art2.pdf>
7. Belenkii B.G. *Vysokoehffektivnyi kapillyarnyi ehlektroforez* [Highly efficient capillary electrophoresis]. Saint Petersburg: Nauka Publ., 2009. 320 p. (In Russ.).
8. Belov Yu.V., Kurochkin V.E., Sukhanov V.L. [The spectrophotometric detector for devices of a capillary electrophoresis]. *Nauchnoe Priborostroyeniye* [Scientific Instrumentation], 2009, vol. 19, no. 2, pp. 47–51. URL: <http://iairas.ru/mag/2009/full2/Art5.pdf> (In Russ.).
9. Belov D.A., Belov Yu.V., Manoylov V.V., Kurochkin V.E. [Methods of genetic analysis results processing]. *Nauchnoe Priborostroyeniye* [Scientific Instrumentation], 2014, vol. 24, no. 3, pp. 87–91. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/mag/2014/full3/Art11.pdf>
10. Kozulin R.A. [Optimizing a high-sensitivity laser fluorescence method]. *Opticheskii zhurnal* [Journal of Optical Technology], 2008, vol. 75, no. 5, pp. 3–7. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=10293608>
11. Kozlova P.A., Chubinsky-Nadezhdin I.V., Kulikov Yu.V., Kurochkin V.E., Novikov D.O., Alekseev Ya.I. [Study of analytical sensitivity of laser-induced fluorescence detectors of capillary genetic analyzers]. *Tezisy dokladov Tre'tei ezhegodnoi vserossiiskoi molodezhnoi konferentsii po metodam i priboram dlya analiza biologicheskikh ob"ektov "AnalitBioPribor-2024"* [Proc. III All-Russ. Youth Conf. Meth. Instrum. Analysis Biol. Objects "AnalitBioPribor-2024"]. Saint Petersburg: Izdatel'sko-poligraficheskaya assotsiatsiya vysshikh uchebnykh zavedenii, 2024, pp. 108–111. (In Russ.). URL: <https://analytbiopribor.ru/%D0%A1%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D1%82%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D1%81%D0%BE%D0%B2%20%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D0%BB%D0%B0%D0%B4%D0%BE%D0%B2.pdf>

Contacts: *Vladimirov Fedor Lvovich*,
fedor.vlv3008@gmail.com

Article received by the editorial office on 01.08.2025

INTRODUCTION

The main characteristics of genetic analyzers [1, 2] include the reading length, the maximum analyzed length, the time of standard fragment analysis, the number of fluorescence detection channels, analytical sensitivity, and the dynamic range of signal measurement in each spectral range [3, 4]. Analytical sensitivity determines the minimum concentration of analyzed reagents, such as fluorescently labeled DNA fragments or dyes in model experiments. High sensitivity is of great importance when analyzing samples with a small amount of DNA, which, even after amplification using the polymerase chain reaction, allows obtaining fluorescence intensities close to the noise signal or background radiation [5]. Therefore, studies aimed at increasing the analytical sensitivity of a genetic analyzer and determining its actual value are an urgent task.

FACTORS AFFECTING SENSITIVITY

It is usually assumed that analytical sensitivity is determined by noise in the measuring path, background illumination, and other parasitic effects.

The effect of laser radiation reflected by a single capillary on the sensitivity of fluorescence measurements was studied in [6]. This work concludes that the main contribution to the intensity of background illumination in detectors for capillary electrophoresis systems is made by laser radiation reflected from the capillary. The work shows that for a standard optical scheme with normal incidence of the laser beam on the capillary and under the condition that the radiation from the capillary is collected by a parabolic mirror at an angle of 120° , approximately 4.2% of the power of the laser radiation incident on the capillary is redistributed to the photodetector. The fluorescence luminous flux F under the same conditions is equal to [6]:

$$F = PKT(1 - 10^{-\varepsilon bC}) \approx PKT\varepsilon bC \times \ln 10, \quad (1)$$

where F is the fluorescence flux; K is the quantum yield of the sample; T is the transmission coefficient of the optical system; ε is the molar extinction coefficient of the sample; b is the optical path (capillary diameter); C is the concentration of the fluorescent substance.

Estimates made using this formula for a laser radiation power of $P = 30$ mW, $b = 75$ μm , $T = 0.5$, $\varepsilon = 200\,000$ l/mol, $K = 0.15$ show that the total fluorescence radiation in the entire solid angle is approximately $F \approx 8 \times |C|$, [W]. Thus, at a sample concentration of $C = 10^{-12}$ mol/l, the fluorescence flux is $F = 8 \times 10^{-12}$ W. This flux is uniformly distributed in a total solid angle of 4π . The mirror, given the above parameters, collects radiation in a solid angle of π . Therefore, approx-

imately 25% of the informative signal reaches the photodetector, i.e. $F_{\phi n} = 2 \times 10^{-12}$ W. Meanwhile, with the same laser radiation power of $P = 30$ mW, approximately $P_{\phi n} = 1.3 \times 10^{-3}$ W is reflected toward the photodetector. The use of interference filters allows suppressing parasitic laser radiation reflected by the capillary, but this reduces the transmission of the optical channel, which leads to a decrease in the sensitivity of the system. In order to minimize parasitic laser radiation incident on the photodetector, it was proposed in [6] to use spatial separation of beams due to oblique incidence of laser radiation on the capillary with the sample. This approach is currently used in the genetic analyzer "NANOFOR 05".

A number of works [7–9] note the decisive impact of photodetector noise on the analytical sensitivity of systems based on capillary electrophoresis. The influence of shot noise, fluctuations in the light flux, and signal filtration are considered. In [10], the process of fluorescein photodecomposition under the action of laser radiation is studied. It is shown that photodegradation of the dye reduces the sensitivity of measurements and imposes restrictions on the power of the exciting laser radiation. The results obtained in [10] allow optimizing the laser power, taking into account the time of dye degradation and the time the molecule remains in the laser radiation zone.

In [11], an experimental assessment of the analytical sensitivity of measuring fluorescence signals for the NANOFOR 05 genetic analyzer was carried out. The assessment was carried out for six spectral ranges corresponding to the fluorescence of the dyes most commonly used in genetic research. With the same dye concentration $C = 10^{-9}$ M/L, the signal-to-noise ratio S/N was measured for different dyes. The obtained values are presented in Tab.

Tab. Results of measuring the signal/noise values and analytical sensitivity C_{np} for genetic analyzers "NANOFOR 05" using dye solutions with a concentration of $C = 10^{-9}$ M/L

Different signal values and signal/noise ratios for different dyes are due to differences in luminescence brightness, quantum yield, absorption, and sensitivity of the recording system in different spectral ranges. Analytical sensitivity C_{np} — the minimum concentration of the dye that can be recorded — is determined as follows:

$$C_{np} = C \frac{(S/N)_{np}}{S/N}, \quad (2)$$

where C is the concentration of dyes in the experiment; S/N is the measured signal-to-noise ratio;

$(S/N)_{np}$ is the limiting value of the signal-to-noise ratio.

For reliable recording, the limiting value of the signal-to-noise ratio is usually taken to be $(S/N)_{np} = 3$. The values of analytical sensitivity calculated for this value of the signal-to-noise ratio are given in Tab. and vary from 0.23 to 2.14 M/L for different dyes. Measurements using the "NANOFOR 05" genetic analyzer were carried out in eight capillaries with the same concentration of dyes $C = 10^{-9}$ M/L simultaneously.

The experimental values obtained in [11] are explained by the theoretical dependence of the fluorescence intensity I on the parameters of the substance, obtained earlier in [6]:

$$I = \eta_\lambda \Delta I_e = \eta_\lambda I_e k_\lambda \rho l, \quad (3)$$

where η_λ is the quantum yield of fluorescence; $\Delta I_e = I_e k_\lambda \rho l$ is the amount of radiation absorbed in the substance; k_λ is the absorption coefficient; ρ is the density of the fluorescing substance; l is the length of the optical path (diameter of the capillary).

Differences in analytical sensitivity for different fluorophores are also explained by the fact that the same wavelength $\lambda_e = 488$ nm was used to excite fluorescence, which did not coincide with the absorption maxima of different fluorophores.

CONSTRUCTION OF A MODEL

In this paper, we consider the mutual influence of neighboring capillaries in the capillary array of the genetic analyzer "NANOFOR 05" due to various mechanisms of redistribution of light fluxes.

Let us consider a fragment of the capillary array in the recording system of the genetic analyzer "NANOFOR 05" (Fig. 1).

Fig. 1. A fragment of a capillary array in the recording system of the genetic analyzer "NANOFOR 05". D is the diameter of the entrance pupil of the objective, H is the distance between the capillary ruler and the entrance pupil of the objective, l is the distance between the capillaries

Fig. 1 shows two neighboring capillaries 1 and 2, on which the exciting laser radiation I_e falls. The fluorescence signals I_1 and I_2 arise in the capillaries. The radiation from the capillaries reaches the camera through the objective within the numerical aperture. Let us consider the magnitude of the background illumination of the second capillary, which is caused by the radiation of the first capillary, and its effect on the analytical sensitivity of the recording system.

We will make estimates in a two-dimensional model of light propagation. We will replace solid angles with angles on a plane, since a narrow laser beam of approximately 40 μ m in width is used to excite fluorescence in the genetic analyzer. Reflection and scattering of fluorescence radiation will occur within this narrow band. We will assume that fluorescence radiation propagates at an angle of 2π in a plane perpendicular to the direction of the capillaries in the capillary array. This approach simplifies the calculations of background illumination and allows us to qualitatively estimate the mutual influence of the radiation of neighboring capillaries in the capillary array.

If the total radiation of the second capillary, for which the analytical sensitivity is estimated, is I_2 , then according to the two-dimensional model, the informative signal I_{c2} enters the registration system objective:

$$I_{c2} = I_2 \frac{\beta}{2\pi}, \quad (4)$$

where $\beta = 2 \arctg \frac{D}{2H}$, D is the diameter of the entrance pupil of the objective; H is the distance between the capillary ruler and the entrance pupil of the objective.

From the first capillary the radiation enters the objective:

$$I_{c1} = I_1 \frac{\beta}{2\pi}, \quad (5)$$

where I_1 is the total radiation from the first capillary.

The second capillary is exposed to fluorescence radiation from the first capillary within the angle:

$$\alpha = 2 \arctg \frac{r}{l}, \quad (6)$$

where r is the radius of the capillary; l is the distance between the capillaries.

Since the radiation from the first capillary spreads uniformly in all directions, the second capillary is exposed to radiation:

$$I = I_1 \frac{\alpha}{2\pi}. \quad (7)$$

Part of this radiation gets reflected from the capillary surface I_{omp} and scattered by various defects of the capillary I_{pac} .

In addition, part of the exciting radiation I_e will be reflected from the second capillary $I_{e,omp}$ and scattered by defects $I_{e,pac}$. It is also possible for various contaminants of the capillary to fluoresce under the action of exciting radiation $I_{e,\phi}$. These parasitic radiations will enter the lens of the recording system, creating background illumination:

$$I_{\phi} = I_{omp} + I_{pac} + I_{e,omp} + I_{e,pac} + I_{e,\phi}. \quad (8)$$

Let us consider the influence of these factors on background illumination.

The main part of the light reflected from the capillary is formed on the outer boundary of the capillary, as shown in Fig. 2.

Fig. 2. Reflection of light on the outer surface of the capillary.

D is the diameter of the entrance pupil of the objective, H is the distance between the capillary ruler and the entrance pupil of the objective, r is the radius of the capillary

ANALYSIS OF THE INTENSITY OF FACTORS AFFECTING BACKGROUND LIGHT

A beam incident on the capillary at an angle φ to the normal of the capillary surface with a radius r is reflected at the same angle and enters the entrance pupil of the objective of the recording system. The beams from the adjacent capillary will enter the lens of the recording system under the condition

$$\Delta h = h_2 - h_1 = 2r \sin \frac{\beta}{2} \cos \frac{\pi}{4}, \quad (9)$$

where

$$h_1 = r \sin \left(\frac{\pi}{4} - \frac{\beta}{2} \right),$$

$$h_2 = r \sin \left(\frac{\pi}{4} + \frac{\beta}{2} \right).$$

This interval Δh corresponds to the angle

$$\theta = \arctg \frac{h_1 - h_2}{l}. \quad (10)$$

With the fluorescence intensity in the first and second capillaries I_1 and I_2 , the informative signals entering the lens of the recording system from these capillaries are equal to:

$$I_{c1} = I_1 \frac{\beta}{2\pi}, \quad (11)$$

$$I_{c2} = I_2 \frac{\beta}{2\pi}. \quad (12)$$

The magnitude of the radiation from the first capillary, entering the lens of the recording system as a result of reflection from the second capillary, is equal to:

$$\begin{aligned} I_{\phi 2} &= \frac{\theta}{2\pi} I_1 R = \\ &= \frac{I_1}{2\pi} R \times \arctg \left[\frac{r}{l} \left(2 \cos \frac{\pi}{4} \sin \frac{\beta}{2} \right) \right], \end{aligned} \quad (13)$$

where l is the distance between the capillaries, R is the radiation reflection coefficient at angles close to $\pi/4$.

It should be noted that radiation from a neighboring capillary will be reflected not only from the outer boundary of the capillary but also from its inner surface, provided that the capillary is filled with a gel, which refractive index is approximately equal to the refractive index of the quartz capillary. The approximate path of the rays in this case is shown in Fig. 3.

Fig. 3. The path of rays reflected from the inner surface of the capillary.

D is the diameter of the entrance pupil of the objective, H is the distance between the capillary ruler and the entrance pupil of the objective, r is the radius of the capillary

The estimates made for this case show that the range of heights Δh is significantly smaller, the angle of incidence of light on the capillary is close to the sliding angle, therefore, the reflection coefficient from the inner surface of the capillary is significantly less than that for reflection from the outer surface, so we will not take reflection from inner surfaces into account in the evaluation calculations.

The relative intensity of the reflected radiation in relation to the informative signal of the first capillary is equal to:

$$\gamma_o = \frac{I_{\phi 2}}{I_{c1}} = \frac{1}{\beta} \arctg \left(\frac{2r}{l} \cos \frac{\pi}{4} \sin \frac{\beta}{2} \right) \times R. \quad (14)$$

It is also possible to estimate the effect of reflection of radiation from the capillaries on the value of the signal/background ratio:

$$\begin{aligned} \delta_o &= \frac{I_{c2}}{I_{\phi 2}} = \\ &= \frac{I_2}{I_1} \times \frac{1}{R} \times \frac{\beta}{\arctg \left[\frac{r}{l} \left(2 \cos \frac{\pi}{4} \sin \frac{\beta}{2} \right) \right]}. \end{aligned} \quad (15)$$

For typical values of the parameters of the optical system of the genome sequencer $D = 10$ mm, $H = 50$ mm, $r = 0.09$ mm, the value of Δh — the range of heights from the center of the capillary, upon entering which the reflected rays enter the lens of the recording system — is $\Delta h = 0.00634$ mm, and the angle

$\beta/2$ is equal to:

$$\frac{\beta}{2} = \arctg \frac{D}{2H} = 0.1 \text{ rad.} \quad (16)$$

Using Fresnel formulas, one can estimate the value of the light reflection coefficient for a quartz capillary ($n = 1.46$) at reflection angles near the angle $\pi/4$. For the s component, the reflection coefficient is approximately equal to $R_s = 0.1$ and for the p component $R_p = 0$. The average reflection coefficient is equal to: $\bar{R} = 0.05$.

The dependence of the relative intensity of the reflected radiation, calculated using formula (14) for the specified parameters, is shown in Fig. 4.

Fig. 4. Dependence of the relative intensity of the reflected radiation on the distance between the capillaries.

The dependence of the signal/background ratio for different values of the fluorescence intensity ratio in the first and second capillaries $k = \frac{I_2}{I_1}$, calculated using formula (15), is shown in Fig. 5.

At small distances between the capillaries, a significant part of the fluorescence radiation in one of the capillaries is reflected by the neighboring capillaries. The estimates show that at a distance of 1–2 mm, the capillary reflects more than 1% of the informative signal in the first capillary to the recording system. Reflection of fluorescence radiation leads to a decrease in the signal/background ratio δ .

Fig. 5. Dependence of the signal/background ratio for various values of the fluorescence intensity ratio in the first and second capillaries.

From Fig. 5 it is evident that if $k = 1$, i.e. if fluorescence intensity is the same in adjacent capillaries, parasitic reflection from adjacent capillaries does not have a significant effect on the value of δ . With an increase in the fluorescence intensity in one of the capillaries by 10 times in relation to adjacent capillaries ($k=0.1$), the value of the signal/background ratio will be less than 3 at a distance of up to $l = 1$ mm. An increase in the fluorescence intensity in one of the capillaries by 100 times ($k = 0.01$) makes it impossible to carry out measurements in a row of capillaries.

Another factor affecting background illumination is the scattering of light on various inhomogeneities, contamination, remnants of the polyimide shell, etc.

The scattering value is characterized by the scattering coefficient ξ :

$$\xi = \frac{I_4}{I_3}, \quad (17)$$

where $I_3 = \frac{I_1}{\pi} \arctg \frac{r}{l}$ is the radiation incident on capillary 2 from capillary 1; I_4 is the radiation scattered by capillary 2.

The scattering coefficient is a technological parameter since it is determined by the number of defects, the quality of capillary cleaning, and contamination both inside and outside the capillary. According to experimental data, the scattering coefficient can vary within a wide range $\xi = 0.01$ – 0.0001 .

Since the radiation is scattered uniformly by the capillary in all directions, the scattered radiation I_{p2} will enter the lens of the recording system within the

angle $\beta = 2 \arctg \frac{D}{2H}$:

$$I_{p2} = \frac{I_1}{\pi^2} \xi \times \arctg \frac{r}{l} \times \arctg \frac{D}{2H}. \quad (18)$$

The relative intensity of the scattered radiation with respect to the informative signal of the first capillary will be equal to:

$$\gamma_p = \frac{\xi}{\pi} \arctg \frac{r}{l}. \quad (19)$$

And the signal/background ratio, caused by the scattering of light on technological defects, will be equal to:

$$\delta_p = \frac{I_{c2}}{I_{p2}} \approx \frac{I_2}{I_1} \frac{\pi l H}{\xi r D}. \quad (20)$$

The dependences of the signal/background ratio on the distance between the capillaries for different values of the scattering coefficient ξ and the relative intensity of fluorescence emission in the second capillary $k = \frac{I_2}{I_1}$, calculated using formula (20), are shown in Figs. 6, 7.

Fig. 6. Dependence of the signal/background ratio on the distance between the capillaries for various values of the relative intensity of fluorescence emission in the second capillary. The scattering coefficient of the second capillary $\xi = 0.01$

From Figs. 6 and 7 it is evident that scattering of radiation from adjacent capillaries begins to play

a noticeable role at high values of the scattering coefficient $\xi > 0.01$ and at a large difference in the fluorescence radiation intensity of adjacent capillaries $k < 0.001$.

Fig. 7. Dependence of the signal/background ratio on the distance between the capillaries for various values of the scattering coefficient of the second capillary. The relative signal intensity in the second capillary $k = 0.001$

If noticeable technological defects in the capillary array are not available, the influence of scattering on the background illumination can be neglected, since $R \gg \xi$:

$$\frac{\gamma_o}{\gamma_p} = \frac{R}{\xi} \times 0.71\pi, \quad (21)$$

where γ_o is the relative intensity of reflected radiation in relation to the informative signal of the first capillary; γ_p is the relative intensity of scattered radiation in relation to the informative signal of the first capillary; R is the capillary reflection coefficient; ξ is the capillary scattering coefficient;

Under certain conditions, the exciting laser radiation can also contribute to the background illumination. The recording system may be exposed to scattered excitation radiation and parasitic fluorescence radiation arising from various defects and contaminants. To minimize the exciting laser radiation entering the recording system, interference filters with high absorption at the wavelength of the exciting radiation λ are used. If the intensity of the exciting radiation is I_λ , then the intensity of the radiation scattered by the capillary $I_{p\lambda}$ can be written as follows:

$$I_{p\lambda} = I_\lambda \cdot \xi_\lambda \times 10^{-D_\lambda}, \quad (22)$$

where ξ_λ is the scattering coefficient of the exciting radiation; D_λ is the optical density of the filter at the wavelength of the exciting radiation installed in the recording system.

The informative fluorescence signal in accordance with (3) is equal to:

$$I_{c2} = \eta_\lambda \times \Delta I = I_\lambda \cdot \eta_\lambda \cdot k_\lambda \cdot \rho \cdot l, \quad (23)$$

where η_λ is the fluorescence quantum yield; $\Delta I_\lambda = I_\lambda k_\lambda \rho l$ is the amount of radiation absorbed in the substance; k_λ is the absorption coefficient; ρ is the density of the fluorescing substance; l — optical path length (capillary diameter).

The signal-to-background ratio due to scattering of laser excitation radiation on process defects is equal to:

$$\delta_{p\lambda} = \frac{I_{c2}}{I_{p\lambda}} = \frac{\eta_\lambda k_\lambda \rho l}{\xi_\lambda \times 10^{-D_\lambda}} = \frac{\eta_\lambda k_\lambda}{\xi_\lambda} \rho \cdot l \times 10^{D_\lambda}. \quad (24)$$

Numerical estimates made for typical values of $D_\lambda = 6.0$; $\xi_\lambda = 10^{-4}$ show that the signal-to-background ratio due to scattering of laser radiation is quite high — more than 10^{10} — and does not significantly affect the analytical sensitivity.

Exciting laser radiation can also cause fluorescence of absorption centers. The fluorescence intensity in this case can be written as follows:

$$I_{\phi\lambda} = I_\lambda \cdot \eta_2 \cdot k_2 \cdot \rho_2 \cdot l. \quad (25)$$

where η_2 is the average quantum yield of defect fluorescence; k_2 is the absorption coefficient of laser radiation on defects; ρ_2 is the concentration of defects.

The signal/background ratio due to the fluorescence of defects on the capillary under the action of laser excitation radiation is equal to:

$$\delta_{\phi2} = \frac{I_{c2}}{I_{\phi2}} = \frac{\eta_\lambda k_\lambda \rho}{\eta_2 k_2 \rho_2}. \quad (26)$$

From this formula it follows that even at $\frac{\eta_\lambda}{\eta_2} = 1$, $\frac{k_\lambda}{k_2} = 1$ fluorescence on process defects will play a noticeable role if the concentration of defects is comparable to the concentration of the fluorophore in the capillary. Numerical estimates show that the concentration of defects at which fluorescence on them will play a noticeable role is approximately $\rho_2 = 10^3$ of defects per 50 μm long capillary segment. Usually the concentration of process defects is significantly lower, so this factor does not have a noticeable effect on the resulting signal/background ratio.

Thus, the main contribution to the background illumination of an array of capillaries is made by the reflection of radiation from neighboring capillaries with a high concentration of fluorophores and, accordingly, high fluorescence intensity.

EXPERIMENTAL VERIFICATION OF MODEL ESTIMATES

An experimental check of the considered model of background illumination formation was carried out using a standard capillary array with 8 capillaries. One of the capillaries was filled with 2% colloidal solution based on quantum dots CdS/ZnS (KT-620) and photopolymer. Other capillaries were filled with water.

After filling the capillary with the composition, the photopolymer with quantum dots was polymerized using a UV illuminator with a radiation wavelength of $\lambda = 365$ nm and a power of 3.0 W. The luminescence spectrum of the quantum dots used is shown in Fig. 8.

Fig. 8. Luminescence spectrum of the composition with quantum dots KT-620 and spectral regions of fluorescence of standard dyes used for genetic analysis.

The luminescence spectrum has a maximum in the region of 620 nm, the half-width of the spectrum is approximately 30 nm. A wavelength of 400 nm was used for excitation. The luminescence spectrum was measured on a HITACHI F4010 spectrofluorimeter. The graph shows the spectral regions of fluorescence of standard dyes used for genetic analysis.

The use of quantum dots instead of organic dyes was due to their unique properties. These materials have high fluorescence brightness, which is determined by high values of the extinction coefficient and quantum yield of luminescence. Quantum dots have a wide excitation band, which allows using one source of exciting radiation, for example, in the range of 400–500 nm, to excite the luminescence of quantum dots with various luminescence spectra. Phosphors based on quantum dots are inorganic materials and have high photostability, which allows using powerful laser radiation to excite luminescence without the risk of degradation and burnout of the phosphor. Quantum dots have a very narrow and symmetrical fluorescence peak without any long-wave tails or other features. The position of the fluorescence maximum is determined by the size of the quantum dots and can vary widely.

The image of a capillary array, in which one capillary is filled with quantum dots (on the right), is shown in Fig. 9. The remaining seven capillaries are filled with water and do not luminesce. The adjacent capillaries reflect a noticeable part of the luminescence radiation from the first capillary.

Fig. 9. Array of 8 capillaries. One capillary (1) is filled with quantum dots (right). The remaining capillaries reflect a noticeable part of the luminescence radiation of the first capillary

A binocular microscope with a color video camera (5.0 MP) was used to record the image of the capillary array; the diameter of the entrance pupil of the objective was $D = 54$ mm, the working distance was $H = 70$ mm. Luminescence in the capillary was excited by a LED source with a wavelength of 365 nm.

A light filter blocking ultraviolet radiation was installed in the recording channel. The brightness of the light bands I_i and their width Δh_i were measured in the resulting image. The intensity of reflected radiation was estimated as:

$$E_i = I_i \times \Delta h_i. \quad (27)$$

The experimentally obtained dependence of the reflected radiation intensity on the distance between the capillaries in comparison with the theoretical dependence calculated using formula (14) and taking into account only the reflection from the capillaries is shown in Fig. 10.

Fig. 10. Experimentally obtained dependence of the intensity of reflected radiation on the distance between capillaries in comparison with the theoretical dependence (14).

Calculations using formula (14) were performed with the following parameters: $D = 54$ mm, $H = 70$ mm, $R = 0.07$, $\beta = 0.736$ rad, $r = 0.09$ mm. The experimental and calculated dependences were normalized to the radiation of the first capillary filled with quantum dots. In general, the experimentally obtained dependence of the reflected radiation intensity is quite correctly described by the theoretical dependence. The decrease in the reflected signal at large distances from the luminescent capillary is explained by the fact that less luminescence radiation reaches these capillaries due to the blocking of the radiation by nearby capillaries. The increased values of the relative intensity of the reflected radiation compared to the theoretical dependence at small distances are apparently due to the contribution of scattered radiation, since in the model experiment the array of capillaries was illuminated by a wide beam of exciting radiation. Therefore, the intensity of the radiation incident on the second capillary and subject to scattering was significantly greater compared to the case of radiation reflection, which occurs practically in one plane. It should be noted that in the genetic analyzer, both reflection and scattering occur in one plane, and the theoretical dependences will correctly describe the background illumination.

Since the fluorescence emission of an individual capillary is proportional to the fluorophore concentration in this capillary, then for the effective analytical sensitivity C_{ϕ} and the relative analytical sensitivity

$$\chi = \frac{C}{C_{np}} \text{ we can write, taking into account (15):}$$

$$C_{\phi} = \left(1 + 0.0089 \times \frac{\delta_o \cdot P}{l} \right) C_{np}, \quad (28)$$

$$\chi = \frac{C_{\phi}}{C_{np}} = 1 + 0.0089 \times \frac{\delta_o \cdot p}{l}, \quad (29)$$

where C_{np} is the limiting analytical sensitivity in the case when the fluorophore concentration in all capillaries of the array is the same ($p = 1$); $p = \frac{I_1}{I_2} = \frac{C_1}{C_2}$ is the ratio of the luminescence intensity in the first and second capillaries; C_1 , C_2 are the concentrations of fluorophores in the first and second capillaries.

The dependence of the relative analytical sensitivity on the distance between the capillaries for various values of the ratio of the luminescence intensity in the first and second capillaries p is shown in Fig. 11.

Fig. 11. Dependence of relative analytical sensitivity on the distance between capillaries for different values of $p = 10; 100; 1000; 10\,000$.

From dependence (29) and Fig. 11 it follows that if the luminescence intensities in different capillaries of the array differ insignificantly $p \sim 1$, then the capillaries do not have a significant effect on each other. If $p = 10$, the effective analytical sensitivity decreases by about 2 times in the neighboring capillary. If $p = 100$, the effective analytical sensitivity decreases by 3–11 times within the array of capillaries. If $p = 1000$, the effective analytical sensitivity drops by about 30–110 times and is approximately 3×10^{-9} – 1.1×10^{-8} M/L. If $p = 10\,000$, the effective analytical sensitivity drops by more than 1000 times (10^{-7} M/L).

The effect of intense fluorescence radiation from one of the capillaries on neighboring capillaries in the array was also tested using the "NANOFOR 05" device. A capillary array in which one of the capillaries was filled with quantum dots was placed instead of a standard capillary array. Illumination and reading were performed in the standard mode. A screenshot of the control program is shown in Fig. 12.

Fig. 12. Screenshot of the control program for the "NANOFOR 05" device.

High-intensity fluorescence in one of the capillaries creates a noticeable background illumination in

almost all capillaries in the array and makes it impossible to perform correct measurements.

The results show that to achieve high analytical sensitivity, the fluorophore concentration should be approximately the same in all capillaries in the array. To achieve high sensitivity of the genetic analyzer, using capillary arrays with a large number of capillaries does not make much sense. To reduce the mutual influence of capillaries, the distance between capillaries can be significantly increased.

CONCLUSIONS

Thus, the work considers the effect of reflection and scattering of fluorescence radiation by neighboring capillaries in a capillary array on the analytical sensitivity of a genetic analyzer. Reflected and scattered radiation creates additional background illumination, which can exceed the informative fluorescence signal in some cases. It has been theoretically shown and experimentally confirmed that the main contribution to the background illumination of a capillary array is made by reflection of radiation from neighboring capillaries with a high concentration of fluorophores and, accordingly, high fluorescence intensity. The proposed model of background illumination formation was experimentally verified using a standard capillary array with 8 capillaries, in which one of the capillaries was filled with a colloidal solution based on quantum dots and a photopolymer. The experimentally obtained dependences of the reflected radiation intensity are quite correctly described by a two-dimensional model of the optical system. If the luminescence intensities in different capillaries of the array differ insignificantly, the capillaries do not exert a noticeable influence on each other. With a 1000-fold difference in fluorescence intensity, the effective analytical sensitivity drops approximately 100 times. It follows from the results that to obtain high analytical sensitivity, the fluorophore concentration should be approximately the same in all capillaries of the array. When using capillary arrays with a large number of capillaries, their mutual influence should be taken into account — reflection of fluorescence radiation with both different intensities and different spectral compositions.