

АНАЛИЗАТОР БИОЧИПОВ КАК КОМПОНЕНТ ОБОРУДОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ «ЛАБОРАТОРИЯ-НА-ЧИПЕ»

© 2025 г. В.Е. Барский*, #, Д.А. Юрасов*, Г.М. Детков*, С.А. Поляков*, Р.А. Миахтаков*, Г.Ф. Штылев*, И.Ю. Шишкун*, В.Е. Кузнецова*, В.Е. Шершов*, В.А. Василиков*, О.А. Заседателева*, А.В. Чудинов*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

#E-mail: victorbarsky@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2024 г.

После доработки 06.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

Возможности количественного анализа слабых сигналов от закрепленных на подложке ячеек биочиповых матриц, флуоресценция которых сопоставима по интенсивности с люминесценцией подложки, исследованы с помощью специально разработанного широкопольного цифрового микроскопа – высокочувствительного анализатора биочипов. В спектральном диапазоне цианинового красителя Су5 ($\lambda_{\text{ex}} = 645$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 665$ нм) проведена оценка относительных уровней собственной люминесценции поверхностей ряда материалов, которые могут служить в качестве подложек для матриц биочипов, применяемых в медицинской диагностике. Показано, что на подложке из черного полибутилентерефталата (черный крастин) анализатор позволяет регистрировать флуоресценцию красителя Су5 при его поверхностной концентрации от трех и более молекул/мкм².

Ключевые слова: биочипы, люминесценция, анализатор изображения биочипов.

DOI: 10.31857/S0006302925010231, **EDN:** LTSRWS

Разработка технологий, позволяющих с помощью биологических микрочипов (биочипов) проводить анализ нуклеиновых кислот или белков в автоматическом режиме, без вмешательства оператора и без контакта с внешней средой, давно привлекает многих ученых. Уже появился журнал “Lab on a chip” [1], появилось множество статей, описывающих материалы и компоненты, необходимые для приборов типа «лаборатория-на-чипе» (см., например, работы [2–4]); более того, на рынке уже появились первые образцы подобной продукции [4]. С развитием техники и появлением новых реагентов и новой приборной базы возможности проведения клинических анализов в формате «лаборатория-на-чипе» приобретают реальные очертания.

Важным вкладом в развитие автоматизации анализов явилось расширение параллельно определяемых параметров образца без его разделения на части. Одним из первых реализованных направлений в этой области стало создание технологий биочипов в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (ИМБ РАН) под руководством академика А.Д. Мирзабекова [5]. Развитие этой технологии увенчалось созданием и применением в клинике первых в мире тест-си-

стем на основе биочипов, зарегистрированных национальной системой здравоохранения [6]. Тест-системы на основе биочипов, разработанных в ИМБ РАН, используются для анализа и идентификации детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности биопатогенов [7], маркеров онкозаболеваний [8], генетических факторов, определяющих индивидуальную чувствительность к определенным типам лекарственной терапии [9], а также в процедурах генетической идентификации личности [10] и в популяционных исследованиях [11, 12].

Как следует из сформированных к настоящему времени представлений, все оборудование, необходимое для функционирования систем типа «лаборатория-на-чипе», может быть условно разделено на следующие компоненты:

1. Устройство для выделения целевых нуклеиновых кислот или белков из анализируемого образца.
2. Устройство для проведения амплификации целевых фрагментов нуклеиновых кислот.
3. Устройство для обеспечения специфического взаимодействия амплифицированных фрагментов нуклеиновых кислот или выделенного белка с

молекулярными зондами, иммобилизованными на подложках биочипов.

4. Устройство для регистрации количества образовавшихся комплексов между амплифицированными фрагментами нуклеиновых кислот или белками и иммобилизованными зондами – анализатор биочипов [13].

5. Программа управления работой отдельных компонентов системы и выдачи результатов анализа в удобном для оператора виде [14].

Настоящая статья посвящена развитию устройств, охарактеризованных в п. 4 и представляющих собой высокочувствительные анализаторы взаимодействий целевых молекул нуклеиновых кислот или белков с молекулярными зондами, иммобилизованными на подложках биочипов.

Известные к настоящему времени варианты конструкций анализаторов биочипов можно разделить на два типа. В первом случае для оценки концентраций флуоресцентно меченых молекул, специфично связавшихся с определенными молекулярными зондами, производится последовательное возбуждение микроучастков поверхности биочипа сфокусированным лучом лазера и регистрируется интенсивность возбуждаемой флуоресценции каждого участка. В дальнейшем по сигналам от детектора флуоресценции каждого участка строится полное изображение биочипа. В анализаторах второго типа возбуждающим светом освещают всю матрицу ячеек биочипа и регистрируют изображение ячеек в областях их флуоресценции с помощью ПЗС-камеры (сокр. от «прибор с зарядовой связью»).

Достоинством первого типа анализаторов является их высокая чувствительность при обнаружении минимальных концентраций анализируемого образца. Достоинством второго типа анализаторов является высокая скорость получения информации с биочипов, возможность следить за ходом реакции, простота и меньшая стоимость.

Представленный в настоящей статье прототип высокочувствительного анализатора построен по второму типу, он выполняет функции получения и математической обработки изображения биочипов в свете их флуоресценции. Анализатор позволяет регистрировать флуоресценцию красителя Су5, используемого в качестве метки, при его поверхностной концентрации от трех и более молекул/мкм². Исследованы также оптические свойства подложек, на которых расположены матрицы биочипов, применяемых в медицинской диагностике, и охарактеризован ряд наиболее предпочтительных материалов, для их изготовления.

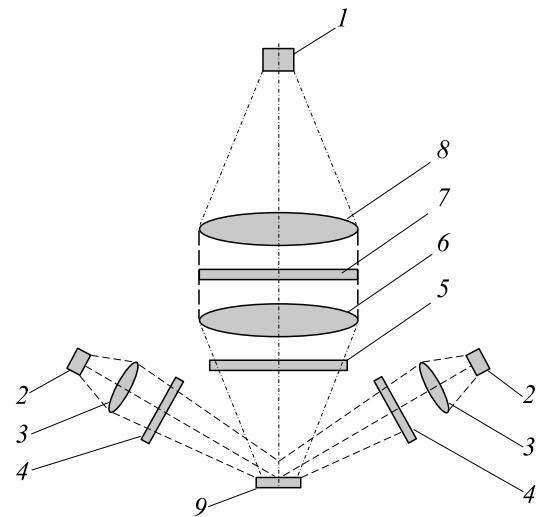


Рис. 1. Оптическая схема анализатора биочипов: 1 – детектор изображения (ПЗС-камера); 2 – источники возбуждающего излучения; 3 – линзы, фокусирующие свет на биочипе; 4 – фильтры для выделения возбуждающего света; 5 – фильтр для выделения света люминесценции; 6 – объектив; 7 – фильтр для выделения света люминесценции; 8 – объектив; 9 – объект (биочип) на плоской подложке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При изготовлении анализатора были использованы следующие коммерчески доступные компоненты: объективы Nikon (Китай) 50×1.4; осветители возбуждающего света – лазеры мощностью 0.5 Вт и излучением при 638 нм (Mitsubishi, Япония); фильтры для возбуждения люминесценции биочипа 640/20 (ООО «ОФИТ», Россия); фильтры для выделения света люминесценции 700/55 (ООО «ОФИТ», Россия); астрономическая камера QHY-178M (Китай); матрица Sony IMX178 STARVIS, сенсор Exmor R размером 6.3 мегапикселей, площадь пикселя 5.76 мкм²; черные прозрачные пленки полиэтилентерефлата (ПЭТ, крастин) толщиной 125 мкм; прозрачная пленка полипропилена толщиной 125 мкм; пленка полистирола толщиной 100 мкм; пленка Topas толщиной 125 мкм.

Анализатор биочипов был изготовлен в соответствии с часто используемой схемой широкопольной цифровой люминесцентной микроскопии [13], позволяющей собрать свет люминесценции исследуемых объектов с максимальной телесной апертурой. В разработанном варианте анализатора использованы два одинаковых объектива Nikon, направленных навстречу друг другу (рис. 1). Объект (биочип) расположен в фокальной плоскости первого объектива, после него свет люминесценции от объекта идет в виде параллельного пучка света. Второй объектив фокусирует свет от первого объектива в своей фокальной

ной плоскости, в которой расположена светочувствительная матрица детектора изображения (ПЗС-камера).

Размер биочипа примерно 5×7 мм (зависит от числа ячеек). Изображение биочипа передается на матрицу в масштабе 1 : 1. Для минимизации паразитного света освещаемое поле зрения сведено к минимуму, чтобы освещалась только матрица ячеек микрочипа. Интерференционные фильтры для возбуждения люминесценции стоят непосредственно после источника возбуждающего света, фильтры для выделения света люминесценции расположены перед объективом и между двумя объективами.

Используя разработанный анализатор биочипов, измеряли значения относительных интенсивностей люминесценции подложек из различных материалов в спектральном диапазоне, соответствующем цианиновому красителю Су5 ($\lambda_{\text{ex}} = 645$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 665$ нм). Процедуры регистрации сигналов и расчеты проводили с помощью программы Image Express [14]. Люминесценцию регистрировали от освещенных участков поверхности площадью около 200×200 мкм² или непосредственно от микрокапель водно-глицериновых растворов Су5, нанесенных на поверхность различных материалов. Для удобства сопоставления результатов сравнивали рассчитанную величину среднего сигнала от участка площадью 1 мкм². Измерения проводили с экспозициями 1, 10 и 30 с.

При сопоставлении измеренных значений интенсивности люминесценции поверхности подложки из черного крастина с интенсивностью флуоресценции нанесенных на эту поверхность микрокапель водно-глицериновых растворов красителя Су5 разных концентраций было обнаружено, что при концентрации $3 \cdot 10^{-10}$ М красителя Су5 в микрокапле интенсивность ее флуоресценции в 3 раза превышает люминесценцию подложки.

Можно таким образом заключить, что при измерениях сигналов флуоресценции с помощью разработанного нами анализатора биочипов, минимальная количественно регистрируемая концентрация красителя Су5 в микрокаплях на поверхности черного крастина составляет $3 \cdot 10^{-10}$ М.

Определение минимальной измеряемой поверхностной концентрации красителя Су5 в расчете на единицу площади подложки (число молекул Су5/площадь объекта, помеченного красителем) проводили следующим образом. Сначала взвесили микропробирку с красителем Су5, из которой будут производиться нанесения. Затем на поверхность крастина нанесли 1000 микрокапель из пробирки. После нанесения вес пробирки уменьшился на 0.3 мг, следовательно, вес одной нанесенной микрокапли составляет 0.3 мкг. Поскольку концентрация

красителя и буфера малы, можно считать, что удельный вес наносимого раствора примерно равен удельному весу 50% раствора глицерина в воде (1.26 г/мл). Отсюда следует, что объем одной капли равен примерно $0.3 \text{ мкг}/(1.2 \text{ г}/\text{мл}) = 0.25 \cdot 10^{-6} \text{ г}/(10^{-3} \text{ л}) = 0.25 \cdot 10^{-9} \text{ л}$.

Поскольку в 1 литре раствора с концентрацией 1 М содержится $6 \cdot 10^{23}$ молекул красителя, то в объеме $0.25 \cdot 10^{-9}$ л при концентрации $3 \cdot 10^{-10}$ М будет содержаться $4.5 \cdot 10^4$ молекул красителя.

Измеренный диаметр нанесенной на крастина микрокапли водно-глицеринового раствора составляет 150 мкм, соответствующая площадь микрокапли на подложке составляет $3.14 \cdot 75^2 \text{ мкм}^2 = 17662 \text{ мкм}^2$. При концентрации $3 \cdot 10^{-10}$ М молекул красителя Су5 в микрокапле поверхностная концентрация молекул Су5 (количество молекул, проецируемых на единицу площади подложки) составляет в среднем $(4.5 \cdot 10^{-4} \text{ молекул})/(17662 \text{ мкм}^2) = 2.6 \text{ молекул}/\text{мкм}^2$.

Таким образом, на подложке, изготовленной из черного крастина, можно регистрировать объекты, содержащие краситель Су5 и превышающие по интенсивности флуоресценции люминесценцию подложки в 3 раза, если поверхностная концентрация Су5 составляет не менее трех молекул на один квадратный микрон.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью изготовленного анализатора биочипов были измерены и помещены в Таблицу 1 значения относительных интенсивностей люминесценции некоторых материалов, которые потенциально могут быть использованы в качестве подложек для изготовления биочипов. Измерения проводили в спектральном диапазоне, соответствующем красителю Су5 ($\lambda_{\text{ex}} = 645$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 665$ нм), который часто применяется в качестве флуоресцентной метки.

Согласно представленным в табл. 1 данным, относительно низкую люминесценцию имеют поверхности кварца, кремния, хрома и черного крастина. Поверхности остальных представленных материалов обладают значительной люминесценцией, их использование в качестве подложек для изготовления биочипов неизбежно будет приводить к снижению предельной чувствительности выявления ячеек с красителем Су5 в качестве метки. Именно поэтому черный крастин нашел практическое применение в качестве подложки биочипов [6–11].

В качестве примера на рис. 2 представлены изображения микрокапель водно-глицеринового раствора с разными концентрациями Су5, нанесенными

Таблица 1. Интенсивность относительной люминесценции поверхности разных материалов

Объект/Выдержка, секунды	1	10	30
Кварц КУ	<10	30	100
Кремниевое зеркало	<10	48	193
Хром	<10	98	310
ПБТ черный (черный крастина)	<10	131	408
Предметное стекло	55	550	1650
Пленка Topas (100 мкм)	107	1185	2150
Алюминий	130	1582	4435
Пленка полипропилен (100 мкм)	183	1540	4221
Пленка полистирол (100 мкм)	550	5681	15 610
ПЭТ прозрачный (125 мкм)	650	6100	17 100
Cy5 в концентрации $3 \cdot 10^{-10}$ М	21	393	1224

Примечание. Условия возбуждения и регистрации соответствуют спектральным характеристикам Cy5. Значения всех величин даны в пересчете на 1 мкм². Указанная концентрация красителя Cy5 дает трехкратное превышение флуоресценции над люминесценцией подложки из черного крастина.

сенных на черный крастин и на пленку Topas. По изображениям можно сделать следующие выводы.

1. Наглядно продемонстрировано, что на подложке с более низкой интенсивностью люминесценции (на черном крастине по сравнению с пленкой Topas) могут быть выявлены более низкие концентрации красителя.

2. Динамический диапазон разработанного нами анализатора позволяет за одно время экспозиции зарегистрировать флуоресценцию ячеек с красителем Cy5 при концентрациях красителя,

которые могут различаться в диапазоне почти 4-х порядков величин (от $5 \cdot 10^{-7}$ М до $3 \cdot 10^{-11}$ М).

Для определения диапазона линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации, в пределах которого может использоваться разработанный анализатор биочипов, были измерены интенсивности флуоресценции микрокапель растворов красителя Cy5 при различных его концентрациях (табл. 2). Измерения проводили при выдержке 15 с. Графическая зависимость интенсивности флуоресценции красителя от его концентрации представлена на рис. 3. Видна

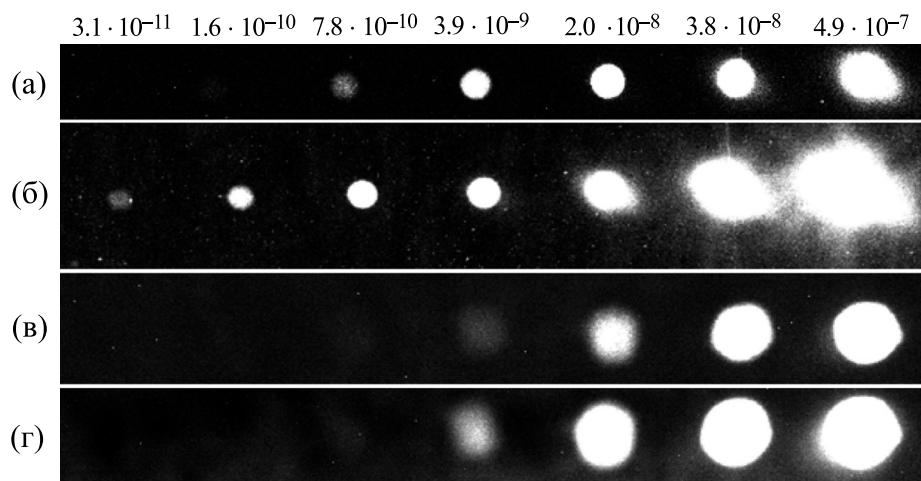


Рис. 2. Изображения микрокапель водно-глицериновых растворов с разными концентрациями красителя Cy5 в свете их люминесценции: (а) – на черном крастине, выдержка 1 с; (б) – на черном крастине, выдержка 30 с; (в) – на пленке Topas, выдержка 1 с; (г) – на пленке Topas, выдержка 10 с. Концентрация красителя между соседними микрокаплями различается в 5 раз в диапазоне концентраций от $4.9 \cdot 10^{-7}$ М (правая капля) до $3.1 \cdot 10^{-11}$ М (левая капля)..

Таблица 2. Интенсивность флуоресценции микрокапель водно-глицериновых растворов красителя Су5 в зависимости от концентрации красителя

C, моль/л	Сигнал, отн. ед.
4.89E-07	7870.2
9.77E-08	2623.6
1.95E-08	580.7
3.91E-09	118.3
7.82E-10	26.5
1.56E-10	7.0
3.13E-11	4.4
0	3.0

Примечание. Микрокапли были нанесены на поверхность черного крастина (экспериментальные условия представлены в разделе «Материалы и методы»).

практически линейная корреляция между концентрацией красителя в ячейках и интенсивностью их флуоресценции в диапазоне от 10^{-8} до $3 \cdot 10^{-10}$ М. Аппроксимация экспериментальных точек (кроме крайней левой точки, соответствующей минимальной концентрации красителя) методом наименьших квадратов с линейной функцией показала линейную корреляцию с коэффи-

циентом детерминации $R^2 = 0.98$. Насыщение пикселей камеры для высоких концентраций не наблюдалось. Более низкая концентрация красителя видна, но лежит в нелинейной области.

ВЫВОДЫ

1. С использованием схемы широкопольной люминесцентной микроскопии был разработан люминесцентный анализатор биочипов, позволяющий регистрировать и количественно определять концентрацию красителя Су5 при поверхностной концентрации молекул красителя от трех молекул на 1 мкм² и выше.

2. Определена интенсивность люминесценции некоторых материалов, которые теоретически могут быть использованы для изготовления биочипов. Показано, что в качестве подложки для биочипов с высокой эффективностью могут применяться кремний, кварц и черный крастин, обладающие достаточно низкой люминесценцией в оптическом диапазоне флуоресценции красителя Су5. Остальные исследованные материалы обладают высокой люминесценцией, что ограничивает их применимость при работе с малыми концентрациями анализируемых мишеней.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00287П).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://www.rsc.org/journals-books-databases/about-journals/lab-on-a-chip/>
2. Ozer T., McMahon C., and Henry C. S. Advances in paper-based analytical devices. *Ann. Rev. Anal. Chem.*, 13 (1), 85–109 (2020). DOI: 10.1146/annurev-anchem- 061318-114845
3. <http://www.moslabo.ru/production/oborudovanie-i-pribory-dlya-laboratori-ii-molekulyarnoj-biologii/>
4. Колчинский А., Грядунов Д., Лысов Ю., Михайлович В., Наседкина Т., Турыгин А., Рубина А., Барский В. и Заседателев А. *Молекулярная биология*, 38, 4–13 (2004).

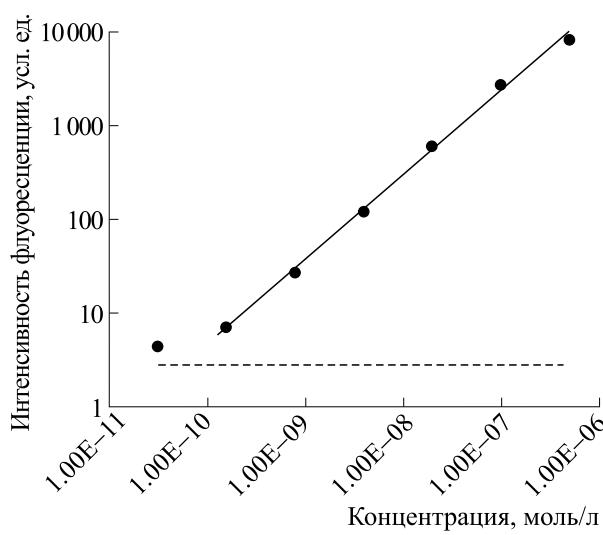


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции красителя Су5 от его концентрации. По оси абсцисс даны концентрации красителя, по оси ординат – интенсивности флуоресценции ячеек. Обе оси даны в логарифмическом масштабе. Данные по оси ординат даны в условных единицах. Горизонтальная линия показывает интенсивность люминесценции подложки (черный крастин).

5. <http://www.biochip.ru/lab/apps/tb-biochip.html#:~:tex>
6. <http://www.biochip-imb.ru/index.php/test-systems/pathogens/9-hcv-biochip>
7. Fesenko D. O., Chudinov A. V., Surzhikov S. A., and Zasedatelev A. S. Biochip-based genotyping assay for detection of polymorphisms in pigmentation genes associated with cutaneous melanoma. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, **20** (4), 208–212 (2016). DOI: 10.1089/gtmb.2015.0272
8. Shaskolskiy B., Kravtsov D., Kandinov I., Gorshkova S., Kubanov A., Solomka V., Deryabin D., Dementieva E., and Gryadunov D. Comparative whole-genome analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates revealed changes in the gonococcal genetic island and specific genes as a link to antimicrobial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **12**, 831336 (2022). DOI: 10.3389/fcimb.2022.831336
9. Фесенко Д. О., Ивановский И. Д., Иванов П. Л., Земская Е. Ю., Поляков С. А., Фесенко О. Е., Филиппова М. А. и Заседателев А. С. Универсальная панель инсерционно-делеционных полиморфизмов ChipID106 для генетической идентификации личности и биочип на ее основе. *Молекуляр. биология*, **57** (4), 632–646 (2023). DOI: 10.31857/S0026898423040067
10. Фесенко Д. О., Ивановский И. Д., Иванов П. Л., Земская Е. Ю., Агапитова А. С., Поляков С. А., Фесенко О. Е., Филиппова М. А. и Заседателев А. С. Биочип для генотипирования полиморфизмов, ассоциированных с цветом глаз, волос, кожи, группой крови, половой принадлежностью, основной гаплотипической группой Y-хромосомы, и его использование для исследования славянской популяции. *Молекуляр. биология*, **56** (5), 860–880 (2022).
11. Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherenpanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., and Zasedatelev A. Microarray analyzer based on wide field fluorescent microscopy with laser illumination and a device for speckle suppression. *Biomed. Opt. Express*, **8** (11), 4798–4808 (2017). DOI: 10.1364/BOE.8.004798
12. <http://www.biochip-imb.ru/index.php/biochip-reader/imageware>
13. <https://www.moslabo.ru/production/oborudovanie-i-pribory-dlya-laboratori-molekulyarnoj-biologii/sistemy-vizualizacii-kletok-dlya-laboratori/bioscience-media-fluorowatcher-fluorescentnyj-imedzher-dlya-fotografirovaniya-svetyashchih-sya-molekul/>

Biochip Analyzer as an Equipment Component in “Lab-on-Chip” Technology

V.E. Barsky*, D.A. Yurasov*, G.M. Detkov*, S.A. Polyakov*, R.A. Miftakhov*, G.F. Shtylev*, I.Yu. Shishkin*, V.E. Kuznetsova*, V.E. Shershov*, V.A. Vasiliskov*, O.A. Zasedatelev*, and A.V. Chudinov*

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

A specially developed wide-field digital microarray analyzer was used for quantitative estimation of weak signals from biochip cells with the fluorescence intensity comparable to that of the substrate material. Luminescence intensity of the different material surfaces that could serve as substrates for biochip matrices used in medical diagnostics was measured in the spectral range of the cyanine dye Cy5 ($\lambda_{\text{ex}} = 645$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 665$ nm). It was shown that the developed digital microarray analyzer allowed recording the dye Cy5 on a substrate made of black polybutylene terephthalate (black crastin) with concentration of 3 or more molecules/ μm^2 .

Keywords: *biochips, luminescence, biochip image analyzer*