

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
31 декабря 2008 (31.12.2008)

РСТ

(10) Номер международной публикации
WO 2009/002225 A2

(51) Международная патентная классификация:
G01N 33/48 (2006.01) G01N 21/00 (2006.01)

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для US):
АФАНАСЬЕВ, Владимир Николаевич (AFANASYEV, Vladimir Nikolaevich) [RU/RU]; м-р «АБ» д. 24, кв. 149, Пушкино, Московской обл., 142290, Puschino (RU). АФАНАСЬЕВА, Гайда Владиславовна (AFANASYEVA, Gaida Vladislavovna) [RU/RU]; м-р «АБ» д. 24, кв. 149, Пушкино, Московской обл., 142290, Puschino (RU). БИРЮКОВ, Сергей Владимирович (BIRYUKOV, Sergey Vladimirovich) [RU/RU]; м-р «Г» д. 25, кв. 96, Пушкино, Московской обл., 142290, Puschino (RU). БЕЛЕЦКИЙ, Игорь Петрович (BELET'SKY, Igor Petrovich) [RU/RU]; м-р «Д», д. 12, кв. 38, Пушкино, Московской обл., 142290, Puschino (RU).

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2008/000389

(22) Дата международной подачи:
23 июня 2008 (23.06.2008)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2007123475 25 июня 2007 (25.06.2007) RU
2007123476 25 июня 2007 (25.06.2007) RU
2007123477 25 июня 2007 (25.06.2007) RU

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: MULTIFUNCTIONAL DIAGNOSIS DEVICE AND A METHOD FOR TESTING BIOLOGICAL OBJECTS

(54) Название изобретения: МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И СПОСОБ ТЕСТИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

(57) Abstract: The invention relates to a multifunctional device for measuring fluorescence, luminescence and light transmission in diagnosis. The test sample carrier is designed in the form of a biochip, cell, pan or a microplate. The device also comprises the first and second groups of screens. Said screens are mounted behind the rear surface of a sample solid carrier and the light sources of the test sample are provided with light absorbing elements for suppressing the light reflected from the front surface of the sample carrier and from the screen surfaces. The holders of the screens make it possible to alternatively mount light reflective and retroreflective screens in such away that the maximum fluorescent or luminescent signal is provided. A diffusing screen makes it possible to measure the light transmission through the test sample. The light-absorbing screens which are located behind the rear surface of the sample, together with the light absorbing elements, which are located on the light sources from the top surface of the sample, make it possible to increase the signal-to-noise ratio. Said device makes it possible to measure signals on the biochip surfaces and in solutions during hybridisation or amplification reactions. The device and a method for processing diagnosis data are suitable for the mass screening of biological material samples.

(57) Реферат: Многофункциональное устройство для измерения флуоресценции, люминесценции, и пропускания света в диагностических целях. Носитель исследуемого образца выполнен в виде биочипа, ячейки, кюветы, или микроплаты. Устройство дополнительно содержит первую и вторую группу экранов. Экраны установлены за задней поверхностью твердого носителя образца, а осветители исследуемого образца снабжены поглощающими элементами для гашения отраженного света от передней поверхности носителя образца и поверхностей экранов. Держатели экранов обеспечивают возможность поочередной установки светоотражающих или световозвращающих экранов таким образом, чтобы обеспечить максимальный сигнал флуоресценции, или люминесценции. Рассеивающий экран обеспечивает режим измерения пропускания света через исследуемый образец. Светопоглощающие экраны, размещенные за задней поверхностью образца в комбинации со светопоглощающими элементами, размещенными на источниках света, с верхней стороны образца, обеспечивают повышение отношение сигнал/шум. Устройство позволяет осуществлять измерение сигналов как на поверхности биочипов, так и в растворах при проведении реакции гибридизации или реакции амплификации. Устройство и метод обработки данных диагностики пригодны для массового скрининга образцов биологических материалов.

WO 2009/002225 A2



OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,

Опубликована:

— без отчёта о международном поиске и с повторной публикацией по получении отчёта

5 Многофункциональное устройство для диагностики и способ тестирования биологических объектов.

Область техники

Изобретение относится к устройству для сканирования результатов диагностики в медицине, ветеринарии, контроле пищевых продуктов, в криминалистике и других сферах диагностики, связанной с анализом биологически
10 активных компонентов. В частности, изобретение относится к устройствам сканирования разных типов объектов, нанесенных на твердый носитель, например, выполненных в виде биочипов, или к устройствам регистрации биологических объектов в растворах, размещенных в кюветах, мультиплатах или гибридных камерах, хроматографических носителях, гелях.

15 Уровень техники

Существует много технических решений, связанных с формированием и регистрацией оптических сигналов, полученных в процессе диагностики биологических образцов. Для регистрации сигнала и идентификации объектов чаще всего используют колориметрические или флуоресцентные метки.

20 Широко распространены узкоспециализированные оптические устройства, предназначенные для работы в одном из режимов измерения оптического сигнала, взаимодействующего с исследуемым образцом. К таким режимам можно отнести измерение оптического пропускания, измерение сигнала отражения от поверхности образца, измерение уровня флуоресценции, люминесценции или
25 измерение сигнала резонансного взаимодействия молекул в режимах BRET [1] или FRET.

В диагностических устройствах биологические образцы могут быть размещены на твердой основе, например, выполненной в виде слайдов [2] или биочипов [3]. В других вариантах, биологические образцы исследуют в растворах,
30 размещенных в открытых ячейках мультилат [1] или в герметичных кюветах, например, для проведения гибридизации [4].

Многофункциональные устройства в основном используют для проведения массовых скринингов в больших тестовых лабораториях, клиниках или научных лабораториях.

Известно многофункциональное устройство для измерения люминесценции, флуоресценции и поглощения [5]. Исследуемый образец может быть размещен в кювете или в микроплате. В устройство введен монохроматор и множество оптических фильтров. Передача оптических сигналов через оптические
5 волокна позволяет преобразовывать оптические системы для работы в разных режимах. В устройстве используется механизм перемещения положения микроплаты под управлением процессора, который дополнительно управляет выбором длины волны.

Известен метод [6], в котором образец детектируют в разных режимах и
10 вычисляют результат детектирования для одного или множества образцов. Результаты анализа получают, используя фотолюминесценцию, хемилюминесценцию, измерение поглощения или рассеяния света. Устройство выполнено по блочному принципу. Для передачи оптических сигналов использованы световоды. Устройство предназначено для измерения в микроплатах
15 с множеством индивидуальных ячеек.

В устройстве [7] с помощью оптических волокон и оптических элементов сформирована схема освещения образца, размещенного в микроплатах и схема измерения оптического сигнала в режимах измерения флуоресценции, люминесценции, а также измерения поглощения света. Для измерения в разных
20 ячейках микроплат используется двухкоординатное перемещение под управлением компьютера.

Известно устройство для измерения люминесценции и флуоресценции [1], которое обеспечивает возможность создания не менее трех вариантов возбуждения люминесценции и флуоресценции и поглощения сигналов за счет формирования
25 разных оптических схем.

К общему недостатку рассмотренных устройств можно отнести большое количество оптических элементов, сложность конструкции и необходимость использования точных механизмов для перемещения объектов по ХУ координатам, механизмов для переключения фильтров и хода оптического
30 сигнала, а также потерю оптических сигналов при передаче сигналов через световоды.

Другая группа устройств диагностики биологических объектов связана с построением конструкций, позволяющих измерять сигналы флуоресценции в

растворах в режиме реального времени, например, при анализе гибридизации или амплификации.

Известно оптическое устройство [8] для мониторинга ПЦР реакции в ячейках, установленных в блок с регулировкой температуры. Эмиссионный световой поток от каждой ячейки, формируемый с помощью линзы Френеля, регистрируется ПЗС детектором. Известно устройство для амплификации и детектирования нуклеиновых кислот в реальном времени [9, 10]. Известно устройство для in-situ детекции люминесценции биологических объектов [2]. В устройстве используют привод, осуществляющий перемещение образца в ХУ координатах под управлением компьютера. Известно устройство для гибридизации нуклеиновых кислот на твердой поверхности биочипов, размещенных внутри жидкостной ячейки [4]. Оптическая схема освещения рабочей поверхности биочипа построена на темнопольном принципе.

Приведенные схемы измерения оптических сигналов в режиме реального времени относятся к узкоспециализированным устройствам, не предполагают работы с биологическими образцами, иммобилизованными на биочипах, не содержат элементов, способствующих увеличению отношения сигнал-шум, и выполнены по стандартным схемам.

Известно большое количество сканеров или микроскопов, работающих на конфокальном принципе, в которых формируется поток ультрафиолетового излучения падающий на лицевую часть поверхности твердого носителя объекта и вызывающий флуоресценцию образца [3, 11 – 18]. Для формирования конфокального принципа изображения устройство содержит большое число дополнительных элементов, имеет малый размер изображения и требует перемещения по координатам ХУ твердого носителя, на котором помещен исследуемый объект, или перемещения оптической системы относительно неподвижного объекта.

Известны устройства, в которых флуоресценцию формируют, пропуская световой поток ультрафиолетового излучения с задней стороны биочипа через прозрачный твердый носитель образца в направлении к приемной ПЗС матрице. Поток УФ-света падает на поверхность носителя в направлении перпендикулярном к поверхности биочипа [19] или под углом к поверхности носителя [20].

Известны оптические сканеры и микроскопы, использующие темнопольный принцип формирования изображения для контроля поверхности [21-22], в том

числе с использованием регистрации флуоресценции [23-26]. Однако в устройствах обращается мало внимания вопросам повышения отношения сигнал-шум и возможности работы в нескольких режимах измерения, например, с возможностью измерения флуоресценции и поглощения светового потока при регистрации колориметрических меток. Во многих оптических схемах формируется узкий световой пучок, что требует применения устройств перемещения слайдов или биочипов в координатах ХУ.

Для того чтобы снизить уровень паразитного излучения и повысить отношение сигнал-шум, в схемы оптических устройств вводят поглощающие элементы. Из уровня техники, которые включены лишь как источники информации, известно, что поглощающие элементы используют в оптических системах контроля качества поверхности полупроводниковых пластин [27-28], применяют в оптических схемах конфокальных микроскопов [29], используют в системах контроля клеток в проточных системах, использующих измерение отраженного сигнала флуоресценции [30].

В некоторых устройствах вопросы повышения уровня сигналов решают, в том числе, за счет формирования двойного прохождения светового потока через исследуемый образец. Известны варианты микроскопов [31-32], в которых формируют двойное прохождение пучка света через исследуемый образец с помощью двух объективов, имеющих идентичные оптические характеристики и дополнительного зеркала, которое размещено с обратной стороны исследуемого объекта за вторым объективом для отражения потока света, проходящего через исследуемый образец. Известен конфокальный лазерный микроскоп [33], в котором использован уголкового отражатель, установленный с противоположной стороны исследуемого объекта и линзы, установленные с лицевой и задней поверхности исследуемого объекта для формирования плоско-параллельного пучка света, падающего на уголкового отражатель, который возвращает падающий свет и направляет его на исследуемый объект, увеличивая контрастность изображения объекта.

Наиболее близкое техническое решение, к рассматриваемому изобретению, представлено в патенте RU 2182328 [24]. Микроскоп позволяет работу в режиме темного поля при измерении сигналов флуоресценции и в режиме пропускания светового потока через прозрачный носитель образца. Недостатками этой системы

являются малое рабочее поле освещения (диаметр около 10мм) и влияние рассеянного излучения, ухудшающее отношение сигнал-шум.

Анализ уровня техники показал, что существует необходимость в разработке более простого и надежного устройства для работы в разных режимах 5 диагностики, в том числе и в режимах реального времени с улучшенными характеристиками отношения сигнал- шум.

Задачей изобретения является максимальное упрощение и удешевление оптической системы с сохранением возможности преобразования оптических схем для выбора разных режимов работы устройства при сканировании исследуемых 10 объектов и при одновременном увеличении отношения сигнал-шум.

Другой задачей является повышение эффективности сканирования за счет построения оптической системы, позволяющей формировать освещение максимально большого рабочего поля биочипа, ячейки или микроплаты.

Следующей задачей настоящего изобретения является разработка 15 конструкции устройства, обеспечивающей возможность работы не только в мультирежимном процессе, но и с возможностью измерения параметров образцов, размещенных в разных средах или иммобилизованных на разных поверхностях в режиме реального времени.

Объектом данного изобретения является устройство для сканирования 20 результатов диагностики и способ проведения диагностики.

В рассматриваемом изобретении возможность смены режимов диагностики осуществляется за счет установки или смены элементов, расположенных вдоль оси оптической системы, и/или вдоль световых пучков, сформированных источниками света. Причем устанавливаемые элементы выполнены в виде экранов с 25 поглощающей, отражающей, световозвращающей или светорассеивающей поверхностью, что позволяет улучшить соотношение сигнал-шум за счет уменьшения паразитного фона и/или увеличения уровня измеряемого сигнала. Дополнительное увеличение отношения сигнал-шум обеспечивает светопоглощающая поверхность, размещенная на поверхности осветителей 30 образца.

Устройство содержит источники оптического излучения, формирующие освещение рабочего поля, оптическую систему, детектор, узел крепления держателя образца, твердый носитель исследуемого образца. Для решения поставленных задач устройство одержит, по меньшей мере, два источника света,

формирующие освещение рабочего поля, оптическую систему, детектор, узел крепления держателя образца, твердый носитель исследуемого образца, а также дополнительно содержит первую и вторую группу экранов, причем первая группа содержит, по крайней мере, один экран, а вторая группа содержит, по меньшей мере, два экрана. Экраны первой и второй группы установлены за задней поверхностью твердого носителя образца, а осветители, установленные над рабочей поверхностью носителя образца, снабжены поглощающими элементами для гашения отраженного света от передней поверхности носителя образца и поверхностей экранов. Экраны первой группы расположены перпендикулярно оптической оси регистрирующей системы, а экраны второй группы расположены перпендикулярно оптическим осям осветителей.

Следующим аспектом данного изобретения является то, что лицевая поверхность первого экрана, входящего в первую группу, выполнена с возможностью отражения или световозвращения световых потоков, поступающих от первого и второго осветителей. Держатель образца выполнен с возможностью крепления первого экрана первой группы на минимальном расстоянии от задней поверхности твердого носителя исследуемого образца. Это расстояние может лежать в пределах от 0,01мм до 10 мм. Предпочтительно, порядка 0,1мм, что позволяет предохранить поверхность зеркала от механических повреждений. Второй экран первой группы размещен относительно задней поверхности твердого носителя образца на расстоянии, превышающем расстояние от точки пересечения нижней границы светового потока и боковой границы оптического конуса регистрирующей системы, до задней поверхности твердого носителя образца. Лицевая поверхность второго экрана первой группы, снабжена светопоглощающим слоем. Третий экран первой группы размещен за вторым экраном, а лицевая поверхность третьего экрана выполнена светорассеивающей в виде белой матовой поверхности.

Следующим аспектом изобретения является то, что устройство дополнительно содержит первый, второй и третий экраны второй группы, размещенные вдоль траекторий осей световых потоков на таком расстоянии от задней поверхности твердого носителя, чтобы край экранов не пересекал оптический конус регистрирующей системы, причем лицевые поверхности первого, второго и третьего экрана второй группы выполнены из отражающих, световозвращающих и поглощающих материалов соответственно.

Дополнительным аспектом изобретения является то, что устройство содержит узлы крепления первого, второго и третьего экранов первой и второй группы, которые обеспечивают возможность введения или вывода из траектории оптической оси регистрирующей системы первого и второго экранов.

5 Узел крепления первого и второго экранов второй группы обеспечивает возможность замены экранов посредством вывода экранов из траекторий оптических осей осветителей или дополнительно содержит шарнирное соединения между узлом крепления и держателем экрана и обеспечивает как возможность замены экранов посредством вывода экранов из траекторий оптических осей осветителей, так и возможность поворота установленных экранов относительно траекторий оптических осей осветителей для вывода экранов из световых пучков при смене режима работы.

Другим объектом данного изобретения является способ проведения диагностических тестов образца, иммобилизованного на твердой основе или размещенного в реакционном объеме. В соответствии с указанным способом выбирают режим диагностики из группы, включающей измерение флуоресценции, люминесценции, рассеяния или пропускания света, поочередно вводят в траекторию оптических осей осветителей и/или в траекторию оптической оси регистрирующей системы один или несколько экранов, помещают объект исследования в держатель образца, вводят его в траекторию оптических осей осветителей и регистрирующей системы, по предварительному изображению на дисплее подбирают условия съемки, получают и запоминают первое изображение объекта, выводят объект из траекторий оптических осей осветителей и регистрирующей системы, получают и запоминают второе изображение, формируют разностное изображение между первым и вторым изображением, попиксельно умножают разностное изображение на нормировочные коэффициенты и запускают программу обработки полученного изображения.

Перечень фигур

- Фиг. 1 Структурная схема универсального сканера биочипов.
- 30 Фиг. 2 Блок схема устройства, подключенного к управляющей системе.
- Фиг. 3 Схема формирования коллимированного пучка света. Где а) диаграмма направленности (индикатриса) излучения СИД; б) индикатриса излучения СИД установленного в черном цилиндре; в) сечение держателя СИД.

Фиг. 4 Схема устройства для диагностики объектов, иммобилизованных на твердой поверхности прозрачного носителя.

Фиг. 5 Схема устройства с комбинированным применением поглощающих и отражающих экранов для диагностики объектов, иммобилизованных на твердой
5 поверхности прозрачного носителя.

Фиг. 6 Схема устройства, обеспечивающая четырехкратное увеличение сигнала флуоресценции или люминесценции

Фиг. 7 Схема преобразования подающего света на поверхность носителя, на котором размещены образцы в виде кластеров с зондами. Где: а) схема
10 преобразования подающего света с применением зеркальной поверхности экрана; б) схема преобразования подающего света с применением световозвращающей поверхности экрана.

Фиг. 8 Схема устройства, позволяющего обеспечить сканирование носителей с объектами, окрашенными колориметрическими метками.

Фиг. 9 Сечение кюветы, предназначенной для работы устройства в режиме
15 ПЦР в реальном времени.

Фиг. 10 Блок-схема алгоритма обработки полученных данных.

Фиг. 11 Изображения кластеров, состоящих из 13 точек, нанесенных на поверхность модифицированного стеклянного чипа в двух вариантах измерения
20 сигнала. Где а) измерение без применения отражающего зеркала; б) измерение с применением отражающего зеркала, как это представлено на фиг. 6.

Структурная схема

В процессе разработки устройства было обнаружено, что технические задачи изобретения, связанные с повышением отношения сигнал-шум и с
25 расширением режимов работы устройства, можно выполнить за счет введения дополнительных экранов и обеспечения возможности ввода и вывода экранов из траекторий оптических осей устройства. Причем повышение отношения сигнал-шум осуществляется за счет выбора оптических свойств поверхности данных экранов, а расширение выбора режимов осуществляется за счет введения не только
30 экранов с поглощающей поверхностью, но и за счет применения экранов с отражающей, световозвращающей и светоизлучающей поверхностями.

Структурная блок-схема устройства приведена на фиг. 1. Устройство состоит из оптической приемной системы (10), подключенной ко входу регистрирующей и управляющей системы (80), первого (31а) и второго (31б)

осветителей, формирующих световой поток с углом расходимости конуса 2β , оптические оси осветителей расположены под углом α к оптической оси (15) приемной системы (10), которая имеет угол сбора света γ . Устройство дополнительно содержит первую (50) и вторую (60а, 60б) группы экранов, а также
5 узел крепления (40) носителей (41) исследуемых объектов.

Более подробно структурная схема устройства приведена на фиг. 2. Устройство содержит следующие основные компоненты: оптическую систему (10), состоящую из первой (11) и второй (12) части, между которыми установлен первый (14) светофильтр, светочувствительный детектор (21), регистрирующую и
10 управляющую систему (80), в состав которой входит узел преобразования сигналов (82), компьютер (83) для сбора и обработки данных, поступающих от светочувствительного детектора (21), а также для выработки управляющих сигналов на отключение или переключение узлов устройства, например, таких как источник питания (84). В состав устройства входит дисплей (81) первый (31а) и
15 второй (31б) осветители, узел крепления (40) (на фиг.2 не показан) носителя (41) объекта исследования, первую группу экранов (50), вторую группу экранов (61а, 61б). Причем экраны первой группы расположены вдоль оптической оси (15), а экраны второй группы расположены симметрично относительно траектории оптической оси (15) и размещены вдоль оптических траекторий световых потоков
20 (16а) и (16б), формируемых первым (31а) и вторым (31б) осветителями.

Устройство работает следующим образом. Свет от первого (31а) и второго (31б) осветителей падает на лицевую поверхность (42) носителя (41) объекта исследования под острыми углами, лежащими в диапазоне от $(\alpha-\beta)$ до $(\alpha+\beta)$ по отношению к оптической оси (15). Свет люминесценции образца собирается
25 оптической системой (10) и направляется на светочувствительный детектор (21). Часть света проникает через прозрачный носитель (41) образца и поступает в зону расположения экранов, входящих в первую (50) и вторую группу (61а, 61б). В зависимости от выбранного режима работы осуществляют установку разных типов экранов первой (50) и второй (61а, 61б) группы. Простая замена или вывод
30 поглощающих, отражающих или световозвращающих экранов из траекторий оптических осей является наиболее легко реализуемой и приводит к улучшению эксплуатационных характеристик устройства.

Центры первой группы экранов (50) совмещены с оптической осью (15) устройства, а поверхности экранов расположены перпендикулярно оптической оси

устройства. Центры второй группы экранов (61а, 61б) совмещены с траекториями оптических осей (16а, 16б) осветителей, а поверхности экранов второй группы расположены перпендикулярно траекториям оптических осей 16а и 16б.

5 Причем вторую группу экранов размещают относительно задней поверхности твердого носителя образца на расстоянии (19), превышающем расстояние от задней поверхности (43) носителя образца (41) до точки пересечения нижних границ (22а, 22б) световых потоков и боковых границ (24а, 24б) оптического конуса (18) оптической системы (10). В этом случае отраженный свет от экранов (60а, 60б) второй группы не будет попадать на лицевую поверхность
10 (55) второго экрана первой группы и, одновременно, отраженный свет от лицевой поверхности экранов (60а, 60б) второй группы не будет собираться оптической системой (10).

Носитель (41) исследуемого объекта размещен строго перпендикулярно оптической оси (15) устройства таким образом, чтобы рабочее пространство, на
15 котором размещен исследуемый объект, располагалось внутри поля зрения АВ регистрирующей оптической системы (10), а рабочая поверхность совмещалась с передней фокальной плоскостью первой части (11) оптической системы (10). Устройство позиционирования и крепления (40) носителя (41) объекта исследования выполнено с возможностью смены носителей в ручном или
20 автоматическом режимах. Поле зрения АВ на рабочей поверхности носителя (41) освещается с помощью двух одинаковых, симметрично расположенных относительно оптической оси устройства, источников возбуждающего излучения (31а, 31б). Конструкция держателей осветителей выполнена с возможностью ручной или автоматической смены осветителей.

25 В устройстве реализован принцип темнопольного освещения. Оптическая ось (16а, 16б) осветителей составляет острый угол α с оптической осью (15) устройства, при этом выполняется соотношение $(\alpha - \beta) > \gamma/2$. В этом случае возбуждающее излучение (в том числе зеркально отраженное от объекта) не попадает в оптическую систему (10).

30 Угол α и расстояние от осветителей (31а, 31б) до исследуемого объекта можно менять в процессе юстировки устройства для улучшения равномерности освещения. На фиг.2 пунктиром показаны крайние лучи AD (24б) и BC (24а), собираемые регистрирующей оптикой. При поглощении возбуждающего излучения молекулы флуорохрома, связанные с объектом, флуоресцируют. Свет

флуоресценции собирается первой частью (11) оптической системы (10), имеющей числовую апертуру $NA = \sin(\gamma/2)$. Входной люк CD ограничивает поле зрения оптической системы. На ее выходе имеет место телецентрический ход лучей, т.к. рабочая поверхность объекта совмещена с передней фокальной плоскостью первой части (11) оптической системы. Формирование телецентрического хода лучей необходимо для корректной работы первого интерференционного светофильтра (14). Далее, в случае измерения флуоресценции, свет проходит через полосовой интерференционный светофильтр (14), спектральные характеристики которого выбираются таким образом, чтобы с одной стороны пропустить максимум полезного сигнала (света флуоресценции метки), а с другой – обеспечить минимум проникновения паразитного фонового света на детектор (21).

Последнее условие обеспечивается, в основном, тремя факторами: а) минимальным проникновением возбуждающего света в канал регистрации. На этот фактор влияют угол падения пучка возбуждающего света α , угол расходимости пучка β , качество поверхностей объекта и зеркал (отсутствие паразитного рассеяния света), общее поглощение возбуждающего излучения внутри прибора, б) минимальным интегралом перекрытия спектров пропускания возбуждающего (32а, 32б) и регистрирующего (14) светофильтров, а также способностью светофильтра (14) подавлять возбуждающее излучение; в) минимальной собственной флуоресценцией материала носителя (41) объекта и светофильтра (14) в полосе пропускания светофильтра (14). Конструкция устройства позволяет менять светофильтры (14) в ручном или автоматическом режиме. Свет, прошедший через светофильтр (14), собирается второй частью (12) оптической системы, в задней фокальной плоскости которой находится фоточувствительный слой матрицы светочувствительных элементов (21), например, ПЗС-матрицы. Заметим, что размер поля зрения АВ связан с размером изображения А'В', формируемого на поверхности матрицы, соотношением $AB = A'B' \times (F1/F2)$, где F1 – фокусное расстояние первой части (11) оптической системы, а F2 – фокусное расстояние второй части (12) оптической системы. Параметры оптических систем выбираются таким образом, чтобы изображение А'В' полностью заполняло матрицу (21), входное отверстие PQ второй части (12) оптической системы равнялось выходному отверстию KM первой, а числовые апертуры были максимально большими.

Светочувствительные элементы матрицы (21) преобразуют световой сигнал в электрический. Далее этот сигнал считывается, преобразуется линейным образом, оцифровывается и передается электронным устройством (82) в компьютер (83), на дисплее которого формируется изображение рабочей области объекта.

Оптическая система.

Первая 11 и вторая 12 части оптической системы (10) представляют собой высококачественные оптические системы (объективы) с высоким светопропусканием, свободные в значительной степени от геометрических и хроматических aberrаций. Хроматические aberrации в меньшей степени способны влиять на точность измерений, т.к. оптика работает в квазимонохроматическом свете, выделяемом светофильтром 14. Неточность фокусировки, возникающая при смене длин волн, не сказывается на работе, т.к. глубина резкости оптической системы достаточно велика (порядка 0,5-0,7 мм).

Среди прочих характеристик объективов можно выделить: разрешающую способность, коэффициент передачи контраста, коэффициент интегрального и спектрального пропускания света, коэффициент светорассеяния, падение освещенности (светосбора) по полю изображения.

Большинство известных оптических систем для формирования первой части оптической системы (11) используют короткофокусные объективы с небольшим рабочим отрезком. Это приводит к сокращению пространства между первой частью (11) оптической системы и поверхностью носителя (41) объекта исследования. Сокращение пространства создает проблемы с формированием освещения рабочей зоны. В известном патенте RU 2182328 [24] в одном из вариантов устройства держатели осветителей устанавливают непосредственно на объектив. Такое решение не позволяет включать между первой частью оптической системы и поверхностью носителя образца вспомогательные элементы, например, конструкции держателей ячеек или нагреватели ячеек для регистрации процессов в режиме реального времени.

В предлагаемом устройстве в качестве первой части (11) оптической системы (10) использован объектив с большим фокусным расстоянием, что позволяет расширить размеры рабочей области. Размер рабочей области объекта можно варьировать в широких пределах (например, от 10 до 90 мм). В качестве первой части (11) оптической системы целесообразно использовать проекционный

или фотографический объективы, серийно выпускаемые промышленностью. Важными параметрами являются фокусное расстояние, рабочий отрезок, линейное поле зрения, числовая апертура, входной и выходной люки. Например, фокусное расстояние фото- и проекционных объективов может меняться от 50 до 110 мм. 5 апертура от 0,17 до 0,26, поле зрения от 36x24 мм до 90x60 мм, рабочий отрезок от 45 до 95 мм.

Рабочий отрезок (расстояние от первой линзы до фокальной плоскости) объектива 11 должен быть достаточно большим, чтобы не препятствовать прохождению света от осветителей. Разрешение первой оптической системы 10 должно быть не менее 20 линий на 1 мм.

В качестве второй оптической системы целесообразно выбирать объектив, специально рассчитанный на работу со светочувствительными матрицами, например, ТВ-объектив или объектив цифровой камеры. Достаточно использовать объектив с фиксированным фокусным расстоянием (монофокальный) и с ручной 15 установкой диафрагмы. ТВ-объективы целесообразно использовать с фокусным расстоянием от 25 до 12 мм, рассчитанными на матрицу 2/3" или 1/2". ТВ-объективы необходимо выбирать с высоким разрешением («мегапиксельные»), предназначенные для машинного зрения (минимум геометрических aberrаций).

Используемый объектив должен быть рассчитан на работу с матрицей 20 определенного размера. Однако он может использоваться и с матрицами меньшего размера. Например, объектив, имеющий маркировку 2/3" может также работать с матрицами 1/2", 1/3" и т.д. В настоящее время выпускается широкая номенклатура монохромных ПЗС и КМОП-матриц с типоразмерами от 1/6" до 1,8" и более. Наиболее употребительными являются размеры 1/3" (диагональ 6 мм), 1/2" 25 (диагональ 8 мм) и 2/3" (диагональ 11 мм). Матрицы от 1" и более дороги, а матрицы 1/4" и менее имеют малый динамический диапазон и большие шумы.

Линейное увеличение, даваемое системой равно $\Gamma = F1/F2$. Поэтому фокусное расстояние ТВ-объектива выбирают исходя из размеров рабочей зоны А'В' объекта исследования, фокусного расстояния первого объектива и размеров 30 матрицы. Важно, чтобы входной люк PQ второго объектива примерно равнялся выходному люку KM первого объектива и светопропускающему диаметру интерференционного светофильтра 14.

Интерференционные светофильтры (32а, 32б), расположенные на осветителях имеют полосу пропускания от 40 до 60 нм. Светофильтр (14) имеет

полосу пропускания от 30 до 50 нм. Очень важно, чтобы интеграл перекрытия спектров пропускания светофильтров (32а, 32б) и (14) был минимальным, т.к. от этого напрямую зависит соотношение сигнал/шум устройства. Фильтры, должны иметь гарантированное ослабление света вне полосы пропускания равное 10^6 , а фактически 10^8 (по данным производителя). Эмпирически установлен критерий подбора пары фильтров (14) и (32) как отсутствие видимого свечения светоизлучающих диодов (СИД), оцениваемое визуально в темном помещении, при наложении светофильтра (14) на светофильтр (32) при включенном на максимальную мощность осветителе.

Используемые технические решения позволяют работать с ПЗС-матрицами без охлаждения.

Осветитель

Для того чтобы реализовать возможности сканирования больших поверхностей в простых оптических системах, необходимо добиваться максимальной равномерности освещенности объекта. Эта задача не является тривиальной. Существуют ограничения в использовании лазерных источников из-за резкой неравномерности плотности излучения по сечению лазерного пучка, а также ламп, формирующих широкий спектр светового потока, из-за необходимости ведения в конструкцию элементов, которые увеличивают ее габариты и стоимость. Более предпочтительными в настоящее время являются осветители на основе матриц СИД, имеющие малую стоимость и габариты.

Известно применение СИД для создания флуоресцентных сканеров или микроскопа, ориентированного на сканирование биочипов [24, 34]. С помощью СИД возможно обеспечить освещение образца и возбуждение его флуоресценции для разных схем регистрации флуоресценции. Из-за малых размеров СИД их можно размещать рядом с объективом или в корпусе объектива, или использовать световоды для передачи возбуждающего света от удаленных источников света, создавать освещение, падающее под углом к лицевой или к задней поверхности биочипа или формировать пучок, который направлен перпендикулярно задней поверхности прозрачного твердого носителя [35].

В устройствах при использовании интерференционной оптики необходимо формировать параллельный пучок света. Эту проблему решают введением дополнительных коллимационных линз [36-37] параболических рефлекторов [38], комбинаций щелевых экранов и цилиндрических линз [39], а также с помощью

комбинаций матриц СИД с матрицами, состоящими из множества линз [40]. К недостаткам таких решений можно отнести дополнительное увеличение стоимости осветителей и увеличение количества конструктивных узлов.

В процессе разработки устройства было обнаружено, что смещение индивидуального СИД от внешней поверхности держателя СИД внутрь цилиндрического отверстия, в которое установлен СИД, имеющий цилиндрическую форму и сферическую или параболическую линзу на торце, позволяет в случае нанесения поглощающего материала на стенки отверстия сформировать коллимированный пучок света без применения дополнительных линз или сложных конструктивных решений. Таким образом, устраняется часть паразитного фона, которая возникала бы при облучении поверхности объекта источником, рассеивающим свет на окружающие поверхности осветителя и держателя образца.

На фиг. 3 представлена схема формирования коллимированного пучка с помощью черного цилиндра выполненного в корпусе осветителя. На фиг.3а представлена диаграмма направленности (индикатриса) излучения СИД (34). На фиг 3б представлена индикатриса излучения СИД установленного в черном цилиндре (36) в держателе (33) СИД в соответствии с фиг.3в. Расстояние H между лицевой поверхностью держателя СИД (33) и торцом СИД лежит в пределах от 1 до 5 мм, что обеспечивает формирование пучка светового потока удовлетворяющего условию допустимой расходимости пучка, при котором угол β не превышает предельно допустимого угла, указанного в технических условиях эксплуатации используемого светофильтра (32) (обычно угол расходимости β лежит в пределах от 4 до 7,5 градусов). Длина отверстия (толщина держателя) подобрана таким образом, чтобы пропускать только лучи, удовлетворяющие условию допустимой расходимости пучка. То есть, чтобы угол β не превышал предельно допустимого угла, указанного в технических условиях эксплуатации используемого светофильтра (32) (обычно 5 градусов). Необходимо отметить, что в данном устройстве поглощается не более 10% излучаемого света.

Каждый осветитель(31а, 31б), формирующий световой поток с определенной спектральной полосой возбуждающего света, состоит из трех основных элементов – светонепроницаемого кожуха (37), интерференционного светофильтра (32) и держателя (33), содержащего упорядоченный массив СИД.

Светонепроницаемый кожух (37) ограничивает световой пучок таким образом, чтобы освещать площадку немного большую, чем поле зрения АВ. Кожух (37) покрыт снаружи и изнутри черным матовым светопоглощающим слоем (38).

5 Держатель (33) представляет собой металлическую пластину, толщина которой выбирается специальным образом. В пластине сформирован упорядоченный массив круглых сквозных отверстий, диаметр которых соответствуют диаметру СИД (предпочтительно 5,0 мм или 3,0 мм). Оси отверстий перпендикулярны передней поверхности держателя. Вся поверхность держателя (33) и отверстий (36) покрыта черным матовым светопоглощающим слоем.

10 Упорядоченный массив отверстий обладает свойствами поворотной симметрии 6-го или 4-го порядка (гексагональная или ортогональная упаковка). Благодаря этому достигаются максимальная плотность монтажа СИД и (или) равномерность освещения. В отверстия плотно монтируются круглые СИД стандартного типоразмера (диаметром 5,0 мм или 3,0 мм). Металлический
15 держатель (33) служит теплоотводящим элементом. Круглые отверстия позволяют в процессе изготовления осветителя поворачивать СИД относительно их продольной оси на произвольный угол, располагая их в совокупности так, чтобы обеспечить максимальную равномерность освещения рабочей области объекта.

Форма и размеры образованного таким образом массива СИД выбирается
20 так, чтобы его (массива) проекция на плоскость объекта примерно соответствовала форме рабочей области исследуемого объекта. Массив СИД может образовывать форму круга, овала, прямоугольника, квадрата, многоугольника, треугольника.

Вместе с тем, форму массива выбирают с учетом размера и формы серийно выпускающихся интерференционных светофильтров. Светофильтр должен
25 полностью покрывать все отверстия массива, не ограничивая свет. Предпочтительным являются светофильтры круглой формы, с внешними диаметрами 25 мм, 30 мм, 50 мм, как наиболее массово производимые и, следовательно, дешевые.

Светофильтр (32) плотно примыкает к передней поверхности держателя
30 (33), располагаясь строго перпендикулярно продольным осям СИД. С этой целью держатель СИД имеет круглую проточку для точной фиксации светофильтра, являющуюся одновременно оптическим затвором, препятствующим боковому распространению света СИД.

Собранный таким образом осветитель является распределенным излучателем. Равномерность и интенсивность освещения зоны измерения возрастает за счет наложения световых пятен от каждого СИД. Применение двух симметрично расположенных осветителей повышает равномерность и мощность

5 освещения.

Расстояние от осветителей (31а, 31б) до центра рабочей зоны, в которой размещен исследуемый объект, выбирается таким образом, чтобы световое пятно, формируемое на поверхности объекта одним СИД, примерно соответствовало минимальному размеру освещаемой зоны.

10 Угол падения лучей α может меняться от 40 до 60 градусов и зависит от параметров (рабочего отрезка, числовой апертуры) первой части (11) оптической системы (10). Чем больше угол α (см.фиг.1), тем меньше расстояние от задней поверхности носителя объекта до экранов (компактнее конструкция), но тем меньше освещенность объекта.

15 Расстояние между осветителями (31а, 31б) и лицевой поверхностью носителя (42), а также угол α можно менять незначительно во время юстировки устройства. При этом оптические оси осветителей (16а, 16б) после настройки могут не проходить через центр объекта, сопряженный с оптической осью (15). Предпочтительное расстояние между осветителями (31а, 31б) и центром объекта

20 исследования составляет порядка 70 мм при угле $\alpha=55^\circ$ для объектов, размещенных на биочипах размером 26x76мм.

Конструкция устройства выполнена с возможностью смены осветителей, предназначенных для возбуждения флуоресценции различных флуорохромов. Полосовые интерференционные светофильтры (32а, 32б) выделяет такой

25 спектральный диапазон света, который необходим для возбуждения флуоресценции метки.

Доминантные длины волн выпускаемых СИД УФ и видимого диапазона:
365±375 нм; 405±5 нм; 475±5 нм; 505 нм; 525 нм; 565 нм; 575 нм; 595 нм; 625±5 нм; 660 нм; белый свет. Мощность излучения СИД выбирают в диапазоне от 10 до

30 25 мВт. СИД выбирают таким образом, чтобы их доминантная длина волны излучения попадала в полосу пропускания фильтра и максимально соответствовала максимуму спектра возбуждения флуорохрома. Использование массива СИД не только многократно повышает интенсивность возбуждающего

света, но и значительно увеличивает равномерность освещения рабочей области объекта.

Питание СИД.

5 Источник питания (84) позволяет осуществлять четыре режима питания СИД или их комбинацию:

1. Последовательное включение СИД и питание их высокостабильным током. Все диоды работают в одинаковых условиях.
2. Последовательное включение СИД и питание их стабильным по амплитуде импульсным током с ШИМ (широтно-импульсная модуляция). Амплитуда
10 тока равна максимально допустимой для данного СИД согласно ТУ. Позволяет регулировать интенсивность света осветителя (31) не изменяя спектр свечения СИД.
3. Параллельное включение СИД и питание их стабильным током. Позволяет индивидуально подстраивать интенсивность свечения каждого СИД для
15 улучшения равномерности освещения.
4. Параллельное включение СИД и питание их стабильным по амплитуде импульсным током с ШИМ. Позволяет, как подстраивать свечение каждого СИД, так и регулировать светоотдачу осветителя (31).

20 Источник питания (84) содержит отключаемую электронную цепь синхронизации питания СИД с сигналом, управляющим длительностью работы электронного затвора светочувствительной матрицы (21). Включение синхронизации позволяет питать СИД (освещать объект) только на короткое время экспозиции кадра (не более 10 сек). При этом средний ток питания СИД может
25 быть увеличен в несколько раз (до 4 раз), что в свою очередь примерно во столько же раз увеличивает интенсивность освещения объекта. Отключение синхронизации переводит работу осветителя в непрерывный режим, например, когда ведется непрерывный покадровый ввод изображений в компьютер.

Конструкция экранов

30 В рассматриваемом изобретении возможность смены режимов диагностики, которые входят в группу, состоящую из режимов измерения флуоресценции, люминесценции, рассеяния и пропускания света, осуществляется за счет установки или смены экранов, расположенных вдоль траектории оси оптической системы, и/или вдоль траектории световых пучков, сформированных источниками света. Причем устанавливаемые экраны позволяют: а) улучшить соотношение сигнал-

шум за счет поглощения паразитных световых потоков, б) повысить уровень полезного сигнала за счет двухкратного прохождения световых потоков через исследуемый образец при отражении или световозвращении световых потоков, в) формировать разные комбинации из экранов первой и второй группы, что

5 позволяет одновременно гасить паразитное излучение и усиливать сигнал при формировании отраженного светового потока. Указанные возможности реализуются за счет поочередного ввода или вывода экранов первой и/или второй группы из траектории оптической оси (15) и/или из траекторий световых пучков (16а, 16б), генерируемых источниками света (31а, 31б).

10 С этой целью, в рамках данного изобретения, первый экран первой группы (51) содержит отражающую или световозвращающую поверхность. Второй экран (52) первой группы содержит поглощающую поверхность. Третий экран (53) первой группы выполнен со светорассеивающей поверхностью. Экраны первой группы, устанавливаемые вдоль оптической оси (15), выполнены с планарной

15 поверхностью, которая перпендикулярна оптической оси (15).

Экраны второй группы содержат экраны с отражающей, световозвращающей или поглощающей поверхностью. Первые экраны (61а, 61б) второй группы с отражающей поверхностью могут быть выполнены в виде планарных пластин или выполнены в виде вогнутой сферической или

20 параболической поверхности с линейным фокусом, который размещен перпендикулярно оптическим осям (16а, 16б) осветителей и параллельно боковой поверхности носителя (41). Вторые экраны (62а, 62б) второй группы выполнены со световозвращающей поверхностью и изготовлены из пластин с планарной поверхностью. Третьи экраны (63а, 63б) второй группы содержат поглощающую

25 поверхность и могут иметь планарную, вогнутую (цилиндрическую, параболическую) или уголковую форму.

Держатели экранов первой (50) и второй (61а, 61б) групп выполнены с возможностью выведения или введения экранов в траектории оптических осей за счет съема или замены экрана, а также за счет поворота экранов относительно

30 оптической оси.

Держатель первого экрана (51) первой группы может быть выполнен в виде отдельного узла или конструктивно объединен с держателем носителя (41) исследуемого образца. В том случае, если вместо планарного носителя (41) образца используют плоские кюветы для проведения реакций гибридизации или

реакций ПЦР, то держатель первого экрана первой группы может быть конструктивным образом связан с креплением дополнительных элементов, выполняющих функции регулирования температуры кюветы при проведении реакции ПЦР и/или реакции гибридизации.

5 В конструкцию крепления экранов второй группы может быть введен дополнительный шарнирный элемент (69а, 69б), приведенный на фиг.4, который обеспечивает возможность изменения угла положения плоскости первого (61а, 61б) и/или второго экрана (62а, 62б) по отношению к траектории осей светового потока (16а, 16б) или держатель экранов может быть выполнен в виде
10 комбинированной конструкции, которая может содержать крепление нескольких экранов, с возможностью их отдельного введения или выведения из траектории оптической оси.

Ниже приведены примеры построения устройств (вариантов) для разных режимов измерения с разными объектами исследования. Данные примеры
15 включают, но не ограничивают других вариантов, которые могут быть выполнены на основе предложенных решений.

Диагностика объектов, иммобилизованных на твердой поверхности прозрачного носителя.

На фиг.4 приведен пример варианта устройства для диагностики объектов
20 иммобилизованных на твердой поверхности прозрачного носителя (41). К таким объектам могут быть отнесены биочипы, срезы тканей, клетки. В данном варианте экраны первой и второй группы снабжены поглощающим слоем. Устройство содержит оптическую систему (10), состоящую из первой (11) и второй (12) части, между которыми установлен первый (14) светофильтр, светочувствительный
25 детектор (21), регистрирующую и управляющую систему (80) (приведенную на фиг.2), первый (31а) и второй (31б) осветители, снабженные вторыми светофильтрами (32а, 32б), узел крепления (40) носителя (41) объекта исследования, второй экран (52), входящий в первую (50) группу экранов, два
третьих экрана (63а, 63б), входящих во вторую группу (60а, 60б) экранов.

30 Лучи выходят из осветителя в виде расходящегося пучка с углом β . Под полем зрения здесь понимается часть плоскости объекта, изображаемая на светочувствительной матрице (21) $A'B'$. Поэтому, при отсутствии виньетирования, поле зрения имеет размеры $\Gamma \cdot A'B'$, где $\Gamma = F1/F2$ - величина увеличения оптической системы (10). Так как светочувствительные матрицы имеют прямоугольную

форму, поле зрения также имеет форму прямоугольника. На фиг. 4 пунктирными линиями (24а, 24б) обозначены крайние лучи, формирующие изображение на матрице (21). Очевидно, что все лучи, проходящие внутри конуса, ограниченного пунктиром (24а, 24б), будут попадать в регистрирующую оптическую систему (10).

Далее возбуждающий свет попадает в рабочую область объекта, где возбуждает флуоресценцию красителя(ей). Часть световых потоков проходит через прозрачный носитель и попадает в пространство за задней поверхностью носителя, в котором размещены экраны первой и второй группы, которые в данном режиме регистрации выполняют функцию поглотителей света.

Существенным отличием технического решения, используемого в данном изобретении по отношению к известным схемам гашения паразитного фона [27-30, 41], является включение поглотителей светового потока не только для гашения отраженного сигнала от лицевой поверхности твердого носителя, на которой размещен исследуемый объект.

Согласно изобретению в устройстве сформировано несколько уровней гашения паразитного фона.

Первый уровень использован для гашения отраженного света в конструкции держателей (33а, 33б) осветителей, в которых внутренние поверхности цилиндрических отверстий, через которые проходит излучение от индивидуальных СИД, покрыты первым слоем поглотителя.

Поглотитель света может быть выполнен в виде абсорбирующего покрытия [42], поглощающей краски или за счет химического чернения внутренней поверхности держателя СИД после выполнения в нем отверстий. В последнем случае держатель диодов выполняют из дюралюминия, сверлят отверстия для установки светодиодов и затем чернят по известным технологиям.

Второй уровень гашения обеспечивают поглощающие элементы (38а, 38б), служащие для гашения света, отраженного от поверхности носителя (41) и держателей экранов второй группы (60а, 60б). Поглощающие элементы размещены на торцевых поверхностях кожухов (37а, 37б), в которых закреплены держатели СИД (33а, 33б). Поглощающие элементы (38а, 38б) могут иметь прямоугольную или квадратную форму. Поверхность элементов (38а, 38б) может быть выполнена в виде планарной, вогнутой цилиндрической или параболической формы. Предпочтительно чтобы размеры гасящего экрана превышали или были

равны размерам светового пучка, отраженного от поверхности (42) носителя образца. В качестве поглощающего элемента может выступить торцевая поверхность кожуха (37а, 37б), на которую нанесено абсорбирующее покрытие, краска или поверхность кожуха может быть химически модифицирована для поглощения света.

Третий уровень гашения световых потоков, которые могут ухудшать соотношение сигнал-шум, размещен за задней поверхностью прозрачного носителя (41).

Основную часть пучка возбуждающего света, прошедшую через прозрачный твердый носитель (41), гасят поглотители (66а, 66б), которые размещены на лицевых поверхностях третьих экранов (63а, 63б), входящих во вторую (60а, 60б) группу экранов. Экраны (63а,63б) могут иметь форму пластины, уголка, параболы или вогнутого цилиндра. Для того чтобы поток света поступал на экраны (63а,63б), первый (61а, 61б) и второй (62а, 62б) экраны выведены из траекторий (16а, 16б) оптических осей осветителей. Вывод может быть осуществлен за счет поворота экранов (61, 62) вокруг шарниров (69а, 69б).

Для того чтобы фоновое возбуждающее излучение, не поглощенное уловителями, а также рассеянное на элементах конструкции, не попадало в оптическую систему (10), в траекторию оптической оси (15) введен планарный экран (52) снабженный поглощающим слоем (55). Экран (52) входит в первую группу экранов (50). Центральная часть экрана (52) совмещена с осью (15) оптической системы (10).

В общем случае поглощающий слой может быть выполнен на основе абсорбирующего материала, входящего в группу, состоящую из пленок, формируемых химическим способом, композиции, включающей носитель и диспергированный пигмент, полимерных или текстильных материалов, снабженных клеящим слоем.

На фиг.5 приведен вариант устройства с комбинированным применением поглощающих и отражающих экранов для диагностики объектов иммобилизованных на твердой поверхности прозрачного носителя (41). К таким объектам могут быть отнесены биочипы, срезы тканей, клетки.

Известны способы повышения эффективности съема данных с биочипов за счет введения зеркальных слоев либо на лицевую поверхность биочипа [43], либо на заднюю поверхность чипа [44], или чип формируют в виде многослойной

конструкции с созданием внутренних линз и нижней отражающей поверхности [45]. Известен микроскоп [32], в котором формируют двойное прохождение пучка света через прозрачный исследуемый образец с помощью двух объективов, имеющих идентичные оптические характеристики и зеркала. Зеркало размещено с
5 обратной стороны исследуемого объекта за вторым объективом и отражает поток света, проходящий через исследуемый образец.

Однако данное решение относится к конкретному типу оптического микроскопа и не предполагают возможности его применения в сканерах с широким рабочим полем или в сканерах с мультирежимным способом работы.
10 Кроме того, в данном устройстве отсутствуют поглотители рассеянного света.

В предлагаемом варианте устройства используется комбинированное применение поглощающих и отражающих экранов. Отличие от ранее рассмотренной схемы, приведенной на фиг. 4, состоит в том, что пучки падающего света, проходя через прозрачный носитель (41), отражаются от зеркальной
15 поверхности экранов (61а, 61б), которые в данном режиме установлены перпендикулярно падающему потоку света. Лицевая поверхность экранов снабжена отражающим слоем (64а, 64б). Экраны (61а, 61б) вводят в траекторию оптических осей осветителей (16а, 16б) либо с помощью поворотных механизмов с использованием шарниров (69а, 69б), либо устанавливают экраны в стационарные
20 держатели (на фиг. 5 не представлены).

За счет отражения от зеркальной поверхности экранов пучки света проходят через прозрачный носитель (41) исследуемого объекта второй раз и далее поглощаются на поверхностях поглотителей (38а, 38б), размещенных на кожухе осветителей (31а, 31б). В результате освещенность рабочей области объекта
25 возрастает до двух раз. Пропорционально освещенности во столько же раз возрастает флуоресценция. Значительно улучшается равномерность освещения. Поверхность зеркал не попадает в пространство конуса (18) оптической системы (10). Таким образом, не вносятся артефактов в изображение. Вместо планарных поверхностей можно использовать собирающие зеркала для лучшей концентрации
30 отраженного пучка на объекте, как это обсуждалось в разделе о конструкции экранов.

Отражающая поверхность (64а, 64б) может быть выполнена в виде зеркала, нанесенного на стеклянный экран или зеркала, напыленного на полимерном

носителе, или выполнена в виде пленки с напыленной отражающей поверхностью, снабженной клеевым слоем.

5 Отраженный от задней поверхности носителя (43) и других элементов конструкции свет гасится на экране (52), поверхность которого снабжена поглощающим слоем (55), что способствует повышению отношения сигнал-шум.

10 Другой вариант устройства, который может быть выполнен на основе конструкции, изображенной на фиг.5, относится к комбинированному применению поглощающего и световозвращающих экранов для диагностики объектов иммобилизованных на твердой поверхности прозрачного носителя (41). В данном варианте экраны (61а, 61б), выводятся из траекторий (16а, 16б) прохождения световых потоков и открывают лицевую поверхность вторых экранов (62а, 62б), входящих в группу вторых (60) экранов, расположенных за задней поверхностью (43) носителя (41) образца.

15 Лицевая поверхность вторых экранов (62а,62б) снабжена световозвращающим слоем. Установка световозвращающих покрытий позволяет вернуть световой поток, который попадает внутрь призм, стеклянных шариков или других световозвращающих структур. За счет полного внутреннего отражения происходит преломление хода пучка света внутри световозвращающих элементов, после чего поток возвращается и падает на обратную сторону (43) носителя (41) образца. В результате освещенность рабочей области объекта возрастает до двух раз. Пропорционально освещенности во столько же раз возрастает флуоресценция.

20 Увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала превышает увеличение фона, поскольку значительная часть рассеянного света, определяющего уровень фонового сигнала, снижается под действием поглотителя (55), нанесенного на экран (52), и поглотителей (38а, 38б), нанесенных на кожух осветителя, что в конечном итоге приводит к повышению отношения сигнал-шум.

В качестве световозвращающего слоя предпочтительно использовать световозвращающие материалы, выполненные в виде панелей, листов или пленок, снабженных клеевым слоем.

30 Известно применение световозвращающих элементов в изготовлении световозвращающих панелей [46] и световозвращающих элементов, выполненных в форме листа [47]. Известны гибкие световозвращающие материалы, которые содержат световозвращающую структуру с плоской лицевой поверхностью и с

множеством расположенных на ее тыльной поверхности основных и дополнительных световозвращающих элементов [48].

Наиболее предпочтительно использовать в качестве световозвращающих материалов покрытия, разработанные фирмой 3М. Фирма предлагает широкий спектр мультислойных световозвращающих покрытий, которые выполнены с применением сфер [49], микроструктурированных поверхностей [50-52].

Наиболее перспективны световозвращающие пленки алмазного типа. Например, пленка серии 3990 VIP фирмы 3М [53] представляет собой материал на основе микропризм, которые обеспечивают более высокую световозвращающую способность. Пленки с нанесенным световозвращающим слоем снабжены самоклеящим составом и наклеиваются при комнатной температуре. Наиболее продолжительный срок службы достигается при наклейке на предварительно подготовленную алюминиевую поверхность экрана.

Световозвращающая поверхность материалов, основанная на использовании кубических угловых призм, изготавливается методом литья или формовки призматических элементов на нижней поверхности очень тонкой подложки. В зависимости от типа материала, на одном квадратном сантиметре поверхности размещается от 7300 до более чем 15500 призм (20).

На фиг.6 приведен вариант устройства, который обеспечивает четырехкратное увеличение сигнала флуоресценции или люминесценции. В соответствии со схемой, приведенной на фиг. 6, в оптические каналы введен первый экран (51), входящий в первую группу экранов (50), который перекрывает как траекторию (15) оптической системы (10), так и траектории (16а, 16б) оптических потоков излучателей света (31а, 31б). В данной конфигурации экран (51) может содержать или зеркальное покрытие или световозвращающее покрытие. Держатель экрана (51) может быть выполнен в виде отдельного узла или конструктивно объединен с держателем носителя (41) исследуемого образца. При этом расстояние между задней поверхностью носителя (41) и лицевой поверхностью отражающего или световозвращающего слоя выбирают минимально возможным, например, 0, 1мм. Зеркало или световозвращающий элемент своей поверхностью полностью перекрывает поле зрения оптической системы (10). Возбуждающий свет проходит через исследуемый объект два раза – в прямом и обратном (за счет отражения или световозвращения) направлениях. При этом освещенность возрастает почти в два раза. Кроме того, свет флуоресценции,

испускаемый в направлении зеркала, отражается от него и также попадает в регистрирующую оптическую систему, что дополнительно почти удваивает светосбор. В результате общее увеличение потока света флуоресценции возрастает до четырех раз. Отличие от известных решений, например от использования биочипов или кювет с зеркальной поверхностью, заключается в том, что отношение сигнал-шум улучшается за счет поглощения рассеянного света, отраженного от верхней поверхности биочипов или кювет, поглощающими элементами (38а, 38б), размещенными на держателях источников света (31а, 31б).

На фиг. 7а и 7б представлены схемы преобразования падающего света (22) на верхнюю поверхность (42) носителя (41) на котором размещены образцы в виде кластеров (2) с зондами (1), на которые гибридизуются молекулы, снабженные флуоресцентными метками. Схема преобразования подающего света с применением зеркальной поверхности экрана, представлена на фиг. 7а и в варианте, когда поверхность экрана снабжена световозвращающей поверхностью - на фиг.7б.

В случае работы с зеркальным экраном, поток света (22), отразившись от отражающей зеркальной поверхности, формирует отраженный поток (23), который вызывает дополнительную флуоресценцию образца. В свою очередь сигнал флуоресценции проникает через прозрачный носитель (41) и, отразившись от зеркального слоя (64), размещенного на экране (61), возвращается через заднюю (43) поверхность прозрачного носителя вторым сигналом флуоресценции (27) дополнительно к первому сигналу (26). Таким образом, общий сигнал, поступающий в оптическую систему (10), теоретически может быть в четыре раза больше, чем в обычных схемах сканеров флуоресценции.

На фиг 7б представлен вариант со световозвращающей поверхностью (67), нанесенной на экран (62) с помощью клеящего слоя (68).

Падающий поток (22), отразившись от световозвращающей поверхности (67) отраженным потоком (28), вновь вызывает флуоресценцию образца. В свою очередь сигнал флуоресценции проникает через прозрачный носитель (41) и, отразившись от световозвращающего слоя (67), возвращается через прозрачный носитель вторым сигналом (30). Таким образом, общий сигнал, поступающий в оптическую систему (10), теоретически может быть в четыре раза больше, чем в обычных схемах сканеров флуоресценции.

Однако с учетом поглощения и рассеяния света на носителе образца и с учетом эффективности работы световозвращающей поверхности, которая снижается при увеличении угла наклона α падающего потока (22), данное техническое решение позволяет обеспечить возврат светового потока через заднюю поверхность (43) носителя (41) и повысить дополнительную освещенность объекта не в четыре раза, как в случае с зеркалом, а от двух до трех раз, в зависимости от типа световозвращающего материала и величины угла наклона α . Однако, световозвращающее покрытие существенно дешевле зеркального.

Зеркало или световозвращающая поверхность попадает в поле зрения оптической системы (10), поэтому к качеству их поверхности предъявляются повышенные требования. В частности, поверхность не должна диффузно рассеивать свет. В противном случае возрастет фон из-за проникновения возбуждающего излучения в канал регистрации. И хотя фон вычитается в процессе обработки изображения, динамический диапазон сигнала сужается. Частицы пыли, адсорбированные на поверхности зеркала или световозвращающей поверхности, способны рассеивать свет и проявляться на первичном изображении (см. Процедуру обработки изображений). Однако они точно так же проявляются на «пустом кадре» без объекта и в разностном кадре не присутствуют.

На фиг. 8 приведен вариант устройства, которое позволяет обеспечить сканирование носителей с объектами, окрашенными колориметрическими метками. Конфигурация применяется для прозрачных объектов, содержащих не флуоресцирующие красители (например, биочипы с кластерами, проявляемыми в ходе пероксидазной цветной реакции). В этом случае регистрируется поглощение света определенной длины волны или белого света.

В данной конфигурации светопоглощающий экран (52) выводится из траектории оптической оси (15) и в траекторию вводится белый матовый, диффузно рассеивающий экран (53). Рассеивающий экран (53) может быть установлен вместо светопоглощающего экрана (52), или перед экраном (52), или предварительно установлен за экраном (52). В последнем случае при выведении экрана (52) лицевая поверхность светорассеивающего экрана (53) вводится в траекторию (15) оптической системы (10).

В устройство дополнительно введены третий (39а) и четвертый (39б) источники света, или самосветящийся (излучающий) экран (54), который обеспечивает возможность освещения рассеивающей лицевой поверхности

третьего экрана (53) с лицевой стороны или с торцевой стороны экрана (53) или с задней стороны экрана (53), как это представлено на фиг. 8.

Осветители (39а, 39б) расположены так, что свет направляется под углом α_2 непосредственно на лицевую поверхность светорассеивающего экрана (53),
5 однако принцип темнопольного освещения сохраняется.

Экран равномерно освещается осветителями (39а, 39б) и рассеивает свет во всех направлениях, в том числе в сторону предмета задней поверхности (43) носителя (41) образца. В осветителях интерференционные светофильтры (32) могут присутствовать, а могут и отсутствовать, т.к. степени монохроматичности
10 света, испускаемого СИД (полоса около 100 нм), оказывается для некоторых задач достаточно.

В регистрирующей оптической системе светофильтр (14) убирается из траектории (15) хода лучей. Доминантная длина волны испускаемого осветителями света должна соответствовать максимуму спектра поглощения
15 красителя. Например, для цветной пероксидазной реакции с диметиламинобензидином это должен быть синий свет (доминантная длина волны СИД 470 – 490 нм).

Объект исследования, иммобилизованный на поверхности (42) носителя (41), находится в фокальной плоскости оптической системы (10). Его изображение
20 резкое. Изображение поверхности экрана (53) оказывается сильно размытым (нерезким) и, таким образом, неравномерности освещения дополнительно сглаживаются. В отсутствие носителя (41) с исследуемым образцом в траектории оптической системы, например, на этапе измерения фона, в кадре имеется равномерный яркий фон. Когда носитель (41) с объектом исследования введен в
25 траекторию оптической системы (10), на белом фоне резко видны более темные кластеры (пятна) с красителем, т.к. при прохождении света сквозь объект часть его поглощается.

Чтобы во время измерения не перегрузить светочувствительную матрицу (21) значительно снижают мощность излучения осветителей (39а, 39б).

30 Особенности объектов исследований

Известно, что биочипы в основном выполняют на твердых подложках, изготовленных из стекла, полимеров, металлов, слюды и их комбинаций.

Наиболее широко распространены биочипы, выполненные на твердой основе, в качестве которой используют микроскопные предметные стекла с

размером 26x76мм [54]. Поверхность стекол либо модифицируется, либо зонды иммобилизуются на немодифицированную поверхность. Модификация поверхности силанами слабо влияет на прозрачность слайдов, поэтому стеклянные слайды могут быть использованы как для формирования биочипов с использованием колориметрических меток [55], так и с использованием флуоресцентных меток [56].

Для повышения чувствительности анализа важно, чтобы материал, из которого изготовлен объект, не флуоресцировал под действием возбуждающего излучения. В частности, при работе со стеклянными слайдами целесообразно использовать возбуждающее излучение с максимумом в районе 625 нм – 635 нм.

В качестве носителя объекта исследования может выступать, по крайней мере, одна тонкая (толщина 1 мм) стандартная спектрофотометрическая кювета. В этом случае измеряется флуоресценция раствора объекта в кювете или поглощение света красителем на определенной длине волны (вариант, представленный на фиг. 8). В случае измерения поглощения возможна установка кюветы сравнения. Носителем объекта может быть проточная кювета. Устройство может работать как ПЦР в реальном времени (Real Time PCR). В этом случае в качестве носителя объекта будет выступать специализированная камера ПЦР. Предлагаемое устройство может быть произвольно ориентировано в пространстве, в частности, оптическая ось (15) может располагаться в горизонтальной или вертикальной плоскости. Это позволяет использовать как закрытые, так и открытые кюветы, ячейки, микроплашки.

Пример одного из вариантов устройства, который включает, но не ограничивает других вариантов изобретения, приведен на фиг. 9.

Согласно изобретению свет направляют под углом α к поверхности ячейки, в которой осуществляют реакцию амплификации. Падающий свет от двух источников света (31а, 31б) преломляется на лицевой поверхности (44) ячейки. Часть света отражается от лицевой поверхности первой стенки ячейки и возвращается на лицевую поверхность противоположного источника, снабженную поглощающим материалом (38), для исключения паразитного фона. Другая часть света проникает через первую стенку ячейки, выполненной из прозрачного материала, и далее, преломившись через границу раздела между первой внутренней стороной (45) первой стенки ячейки и раствором (46), в котором осуществляется амплификация, проникает внутрь раствора, где вызывает

флуоресценцию маркеров, гибридизующихся с зондами (1), которыми снабжены кластеры (2) биомолекул. Проникнув через раствор, свет преломляется на второй границе раздела между внутренней частью (47) второй стенки ячейки и раствором для амплификации. Часть преломленного света возвращается в раствор (46).

5 Другая часть проникает через прозрачный материал (48) второй стенки ячейки и преломляется на границе раздела между воздушным пространством и задней поверхностью (49) второй стенки ячейки. Пройдя через промежуток между задней поверхностью ячейки и лицевой поверхностью первого экрана первой группы, свет отражается от зеркальной поверхности (54) экрана, который приклеен

10 клеевым слоем (56) к держателю ячейки (57), и возвращается через воздушный промежуток и вторую стенку ячейки в раствор для амплификации. Тем самым осуществляется двойной проход пучка света через раствор, что вызывает увеличение сигнала флуоресценции.

Держатель ячейки (57) дополнительно снабжен нагревателем (58) или элементом

15 Пельтье для того, чтобы осуществить регулирование температуры при реакции гибридизации или амплификации.

Приведенные схемы устройства не ограничивают других вариантов размещения других объектов иммобилизованных, например, в микроплате. Для удобства работы пользователя устройство может быть закреплено вертикально,

20 горизонтально или может работать в конфигурации, когда оптическая система размещена в нижней части устройства, для того чтобы освещать заднюю поверхность микроплат.

Описание процедуры обработки изображения.

В зависимости от задач диагностики для измерения флуоресценции или люминесценции используют первый экран первой группы, который устанавливают

25 в держатель образца, или используют второй экран первой группы в комбинации с первыми или вторыми экранами второй группы, или используют второй экран первой группы в комбинации с третьими экранами второй группы. Для измерения пропускания или рассеяния используют третий экран первой группы в комбинации

30 с третьими экранами второй группы.

На фиг. 10 приведен алгоритм способа обработки данных. Окончательное изображение объекта формируется следующим образом. Объект исследования помещается в устройство. По предварительному изображению, получаемому на дисплее (81) компьютера, с помощью устройства (82) подбираются условия

съемки (длительность экспозиции, усиление сигнала), чтобы не происходило насыщения яркости пикселей светочувствительной матрицы (12).

5 Производится захват изображения компьютером. Кадр с изображением объекта запоминается. В этом кадре присутствует как полезный сигнал от объекта, так и накладывающийся на него шумовой сигнал.

10 Затем объект удаляется из устройства и производится съемка «пустого кадра» при тех же условиях. Пустой кадр содержит информацию только о шумовом сигнале, т.к. полезный отсутствует. Пустой кадр фиксирует слабый фоновый свет, свечение частичек пыли на зеркале и других элементах оптики, тепловые шумы и «горячие пиксели» светочувствительной матрицы, постоянную подставку (сдвиг «уровня черного») в сигнале и другие помехи, не связанные с объектом.

15 Далее «пустой кадр» вычитается попиксельно из основного кадра и результат запоминается. Эта процедура минимизирует погрешности измерения. Она корректна, т.к. преобразование сигналов в узле (82) происходит линейным образом.

20 Получившийся разностный кадр умножается попиксельно на соответствующие нормировочные коэффициенты, для того чтобы выровнять изображение по полю зрения АВ. Для того, чтобы учесть (компенсировать) неравномерность освещения поля зрения возбуждающим светом и неравномерность сбора света флуоресценции регистрирующей системой (10).

25 Окончательно сформированный таким образом кадр может быть сохранен компьютером. Несколько кадров от одного объекта могут быть суммированы с усреднением для уменьшения случайных шумов и далее обработаны соответствующими программами по заданным алгоритмам.

30 Заметим, что процедура обработка изображения в фотометрическом варианте происходит так же, как и во флуоресцентном варианте. Из первого изображения, где нет объекта (яркий фон), вычитается изображение с объектом (имеются темные пятна). В результате возникает негативное (на темном фоне светлые пятна) изображение объекта, которое далее выравнивается умножением на нормировочную матрицу.

Получение нормировочных коэффициентов.

Для расчета нормировочных коэффициентов необходимо использовать эталонный объект. Предполагается, что эталонный объект имеет идеально

равномерное распределение плотности излучения света флуоресценции по своей поверхности. В нашем случае эталонный объект должен представлять собой тонкий (не более 0,5 мм), прозрачный однородно флуоресцирующий по площади слой, закрепленный на прозрачном не флуоресцирующем носителе, аналогичном носителю биочипа. Например, это может быть тонкая (<0,1 мм), прозрачная, флуоресцирующая, однородная по толщине (не хуже 1%) пластиковая пленка, прикрепленная к поверхности не флуоресцирующей пластины из пластика, оптического стекла или кварца. Или тонкая плоскопараллельная пластина цветного флуоресцирующего оптического стекла. Или это может быть слой жидкости, содержащий флуоресцирующие молекулы, и находящийся между двумя строго параллельными прозрачными не флуоресцирующими пластинами. Расстояние между пластинами порядка 0,1 – 0,2 мм. Или это может быть молекулярный слой флуорохрома, иммобилизованного на поверхности прозрачной не флуоресцирующей пластины, имеющий строго равномерное распределение по поверхности.

Заметим, что теоретически, в отсутствие аппаратных погрешностей, яркость свечения всех пикселей изображения эталонного объекта должна была бы быть одинакова. Однако вследствие неравномерности освещения объекта осветителями (31), неравномерности сбора света флуоресценции оптической системой (10) и других причин (наличия фона возбуждающего света, наличия погрешностей преобразования света в аналоговый электрический сигнал и его аналого-цифрового преобразования, электронные шумы), яркости пикселей изображения эталонного объекта различаются.

Процедура попиксельной нормировки позволяет существенно, не менее чем в 15 раз, уменьшить общую погрешность измерений. Она заключается в следующем.

Производится съемка одного или нескольких (предпочтительно) эталонных объектов. При обработке эталонных изображений попиксельное умножение на нормировочные коэффициенты не производится или они полагаются равными единице. Полученные кадры суммируются с усреднением (т.е. попиксельно складываются и делятся на число кадров, при необходимости картинка сглаживается по известным математическим процедурам). В результате получается усредненный эталонный кадр, характеризующий, в основном,

неравномерность освещения объекта осветителями (31) и неравномерность сбора света (у краев поля зрения) регистрирующей системой (10).

5 Выбирается значение яркости «эталонного» пикселя, на который будет производиться нормировка. Это может быть самый яркий пиксель эталонного кадра или среднее значение яркости по кадру и т.д.

Для каждого пикселя эталонного кадра рассчитывается коэффициент, равный частному от деления значения яркости «эталонного» пикселя на значение яркости данного пикселя. Очевидно, что при попиксельном умножении (каждый пиксель на свой коэффициент) на эти нормировочные (выравнивающие) 10 коэффициенты, значения яркости всех пикселей эталонного кадра станут равными значению «эталонного» пикселя. Таким образом, происходит выравнивание изображения по полю зрения.

Вычисленные нормировочные коэффициенты запоминаются в виде упорядоченного массива (нормировочной матрицы), которая является 15 своеобразным «паспортом» прибора и сохраняется на все время его эксплуатации.

В фотометрическом варианте при вычислении нормировочных коэффициентов изображение эталонного объекта не используется. Вместо него берется изображение матового экрана.

Для каждой пары осветителей рассчитывается свой массив нормировочных 20 коэффициентов. Коэффициенты вычисляются индивидуально для каждого экземпляра прибора, сохраняются и используются в течение всего времени его эксплуатации. Если происходит переустановка прибора, например, вследствие ремонта, то нормировочные матрицы должны пересчитываться заново.

Узел преобразования сигналов

25 Узел преобразования сигналов (82) содержит схемы управления работой матрицы (21), производит аналого-цифровое преобразование сигнала яркости от каждой ячейки матрицы (21), задает параметры съемки (экспозицию кадра, усиление и т.д.), осуществляет взаимодействие с компьютером (прием и передачу данных) по заданному интерфейсу (например, шине USB), синхронизирует работу 30 осветителей, управляя работой источников питания.

На фиг. 11 представлены изображения кластера, состоящего из 13 точек, нанесенного на поверхность модифицированного стеклянного чипа в двух вариантах измерения сигнала.

В первом варианте измерения использовалась схема устройства, приведенная на фиг.4. Два световых потока от источников света (31а) и (31б) освещают поверхность стеклянного слайда (41) с нанесенными зондами и формируют темновое поле, при котором излучаемый поток не поступает в оптическую систему (10). Отраженное излучение от поверхности слайда поглощается на поверхности гасящих элементов (38а) и (38б). Световые потоки проходят через прозрачный слайд с нанесенным образцом и поглощаются гасителями (66а) и (66б), расположенными перпендикулярно траектории световых потоков. Дополнительно, рассеянный свет гасится на поверхности (55).

10 Применение такого комплекса позволяет снизить уровень фона и получить изображение точек с зондами с максимальным отношением сигнал-шум представленное на фиг 11а.

Во втором варианте измерения использовалась схема устройства, приведенная на фиг. 6. В данной схеме измерения использовалась конструкция устройства, содержащая зеркало (54), расположенное за задней поверхностью слайда. Такое конструктивное решение позволяет увеличить уровень сигнала до четырех раз. Результат такого усиления сигнала представлен на фиг 11б.

Промышленная применимость

Устройство предназначено для регистрации флуоресценции молекул флуорохромо(ов), иммобилизованных на поверхности или в тонком слое объекта, а также для измерения поглощения или рассеяния колориметрически окрашенных кластеров биочипов.

Данное устройство может работать с прозрачными, полупрозрачными, непрозрачными, черными и зеркальными поверхностями. В конструкции устройства отсутствует механическое сканирование объекта исследования в координатах ХУ.

Устройство может работать в качестве флуориметра и фотометра – измерять флуоресценцию и поглощение растворов. Например, измерять концентрацию ДНК, белка и т.д. в растворе или контролировать количество выделенной ДНК, наработанной в ходе ПЦР.

Устройство позволяет проводить кинетические измерения с характерными временами, зависящими от быстродействия электронного устройства 82 (типично 0,1 сек). Для этого используется режим непрерывного ввода изображений (например, видеопотока) с последующей обработкой каждого кадра.

Устройство может работать в произвольной ориентации в пространстве, т.к. объект фиксируется в устройстве позиционирования.

Устройство, созданное согласно изобретению, обладает рядом значительных преимуществ по сравнению с известными решениями. Оно имеет
5 очень простую конструкцию, не предъявляет высоких требований к применяемым оптическим компонентам и, что особенно важно, не ставит никаких специальных условий для ввода излучения возбуждения флуорохрома и/или вывода флуоресцентного излучения. Кроме того, устройство позволяет проводить всевозможные биохимические исследования, а изготовление основных узлов
10 устройства не требует высоких затрат.

Литература:

1. Peukert M. et al. Apparatus for measuring in particular luminescent and/or fluorescent radiation. US Patent 6,949,754 (September 27, 2005).
- 15 2. Froot H. Fluorescent microanalytical system and method for detecting and identifying organic materials. US Patent 4,087,685 (May 2, 1978).
3. Perov A. et al. Biochip scanner device. US Patent 6,329,661 (December 11, 2001).
4. Trulson M. et al. Method and apparatus for imaging a sample on a device. US
20 Patent Appl. 20050281708 (December 22, 2005).
5. Giebeler R. et al. Optical system for a scanning fluorometer. US Patent 6,236,456 (May 22, 2001).
6. Modlin D. et al. Multi-mode light detection system. US Patent 6,825,921 (November 30, 2004).
- 25 7. Fernandes J. et al. Mutli-functional photometer with movable linkage for routing optical fibers. US Patent 5,436,718 (July 25, 1995).
8. Gambini M. et al. Instrument for monitoring polymerase chain reaction of DNA. US Patent 7,008,789 (March 7, 2006).
9. Bickel R. et al. Device for the amplification and detection of nucleic acids. US
30 Patent Appl. 20060078929 (April 13, 2006).
10. Remacle J. et al. Real-time PCR of targets on a micro-array. WO2006053770 (2006-05-26).
11. Perov A. 14. Perov A. et al. Portable biochip scanner device. US Patent 6,407,395 (June 18, 2002).

12. Барский В.Е. Флуоресцентный микроскоп. Патент RU 2166201(2001.04.27).
13. Yokokawa N. et al. Method and apparatus for reading fluorescence. US Patent 6,646,271 (November 11, 2003).
- 5 14. Mathies R. et al. Laser excited confocal microscope fluorescence scanner and method. US Patent 5,091,652 (February 25, 1992).
15. Hueton I. et al. High-speed fluorescence scanner. US Patent 5,459,325 (October 17, 1995).
16. Kureshy F. et al. Microarray detector and methods. US Patent 7,354,389
10 (April 8, 2008).
17. Wang J. et al. Fluorescent microarray analyzer. US Patent 7,042,565 (May 9, 2006).
18. Tanaami T. Biochip reader and fluorometric imaging apparatus. US Patent Appl. 20060029523 (February 9, 2006).
- 15 19. Wang J. et al. CCD-based biochip reader. US Patent 7,173,701 (Feb 6, 2007).
20. Катеркамп А. Устройство и способ проведения количественного анализа средства с использованием флуоресцентных меток. Патент RU 2158916 (2000.11.10).
21. Bevis C. et al. Darkfield inspection system having photodetector array. US
20 Patent 7,061,598 (June 13, 2006).
22. Peterson T. et al. Use of light scattering particles in design, manufacture, and quality control of small volume instruments, devices, and processes. US Patent 6,714,299 (March 30, 2004).
23. Oldham M. et al. Combination reader. US Patent 6,970,240 (November 29,
25 2005).
24. Барский В.Е и др. Флуоресцентный микроскоп. Патент RU 2182328 (2002.05.10).
25. Montagu J. et al. Reading of fluorescent arrays. US Patent Appl. 20060127946 (June 15, 2006).
- 30 26. Albertson D.G. et al. Wide field image for quantitative analysis of microarrays. US Patent Appl. 20050260741 (November 24, 2005).
27. Chhibber R. et al. Method and apparatus for illuminating a substrate during inspection. US Patent Appl. 20050146719 (July 7, 2005).

28. Xu J. et al. Defect review system and method. US Patent Appl. 20050094136 (May 5, 2005).
29. Engelhardt J. et al. Optical system in the ray path of a confocal fluorescence microscope. US Patent 6,785,302 (August 31, 2004).
- 5 30. Ince C. System and method for imaging the reflectance of a substrate. US Patent Appl. 20060241364 (October 26, 2006).
31. Mueller G. et al. Optical system for transmitted-light microscopy with incident illumination. US Patent 4,515,445 (May 7, 1985).
32. Mueller G. et al. Microscope for reflected-light and transmitted-light
10 microscopy. US Patent 7,081,994 (July 25, 2006).
33. Ellis G. et al. Confocal laser scanning transmission microscope. US Patent 5,035,476 (July 30, 1991).
34. Yershov G. et al. Biochip reader with enhanced illumination and bioarray positioning apparatus. US Patent 6,620,623 (September 16, 2003).
- 15 35. Douglas-Hamilton D. et al. Motility scanner and method. US Patent 4,896,967 (January 30, 1990).
36. Hart S. Light emitting diode (LED) array for excitation emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy. US Patent 6,985,224 (January 10, 2006).
37. Panagotacos G. et al. Illuminator assembly. US Patent 7,163,318 (January 16,
20 2007).
38. Stopa J. et al. Led light assembly. US Patent Appl. 20030156416 (August 21, 2003).
39. Tsikos C. et al. Planar LED-based illumination array (PLIA) chips. U. S. Patent 6,959,870 (November 1, 2005).
- 25 40. Lee K. LED package, display panel, illumination system and projection system employing the same. US Patent Appl. 20060146297 (July 6, 2006).
41. Rao N. et al. Optical method and apparatus for inspecting large area planar objects. US Patent Appl. 20020088952 (July 11, 2002).
42. Харрис Д. и др. Композиция покрытия, поглощающего УФ излучение.
30 Заявка RU 2003133667 (2005.05.10).
43. Garini Y. Optical detection method for improved sensitivity. US Patent 6,552,794 (April 22, 2003).
44. Microarray High Sensitivity Mirror Substrates . Материалы фирмы TeleChem International Inc. (<http://arrayit.com/Products/Substrates/Mirror/mirror.html>).

45. Matsushita T. et al. Component, apparatus, and method for analyzing molecules. US Patent 6,999,166 (February 14, 2006).
46. Велигдан Д. Светоперенаправляющая панель. Заявка RU 2001104428 (2003.04.10).
- 5 47. Араки Й. Светоизлучающий световозвращающий лист и способ его изготовления. Патент RU 2204154 (2003.05.10).
48. Молохина Л. и др. Гибкий световозвращающий материал. Патент RU 2183336 (2002.06.10).
- 10 49. Mori Y. Retroreflective sheet comprising microspheres, the diameter and refractive index of which being specifically related to the refractive indices of layers directly in contact therewith. 5,962,121 (October 5, 1999).
50. Smith K. et al. Cube corner cavity based retroreflectors with transparent fill material. US Patent Appl. 20010033907 (October 25, 2001).
51. Smith K. et al. Flexible cube-corner retroreflective sheeting. US Patent Appl. 15 20020126382 (September 12, 2002).
52. Smith K. Retroreflective sheeting having high retroreflectance at low observation angles. US Patent Appl. 20070081245 (April 12, 2007).
53. 3M Diamond Grade VIP Reflective Sheeting Series 3990. Техническое описание фирмы Minnesota Mining and Manufacturing (3M) Product Bulletin 3990 20 November 2003 (<http://multimedia.mmm.com/>)
54. Zeleny R. et al. Automatic imaging and analysis of microarray biochips. US Patent 6,215,894 (April 10, 2001).
- 25 55. Белецкий И.П. и др. Набор праймеров для детекции и/или идентификации трансгенных последовательностей ДНК в растительном материале и его содержащих продуктах (варианты), праймер (варианты), пара праймеров (варианты), способ детекции и/или идентификации с их использованием (варианты) и устройство для осуществления способа. Патент RU2265668 (2005.12.10).
- 30 56. Мирзабеков А. Д. и др. Способ идентификации трансгенных последовательностей ДНК в растительном материале и продуктах на его основе, набор олигонуклеотидов и биочип для осуществления этого способа. Патент RU 2270254 (2006.02.20).

5 Формула

1. Устройство для измерения флуоресценции, люминесценции, рассеяния и пропускания света в диагностических целях, которое содержит, по меньшей мере, два источника света, формирующие освещение рабочего поля, оптическую систему, детектор, узел крепления держателя образца, твердый носитель исследуемого образца, отличающееся тем, что содержит первую и вторую группу экранов, причем первая группа содержит, по крайней мере, один экран, а вторая группа содержит, по меньшей мере, два экрана, где экраны установлены за задней поверхностью твердого носителя образца, а осветители снабжены поглощающими элементами для гашения отраженного света от передней поверхности носителя образца и поверхностей экранов.

2. Устройство по п.1, отличающееся тем, что экраны первой группы расположены перпендикулярно оптической оси регистрирующей системы, а экраны второй группы расположены перпендикулярно оптическим осям осветителей.

3. Устройство по п.1, отличающееся тем, что первый экран, входящий в первую группу, выполнен с возможностью отражения или световозвращения световых потоков первого и второго осветителей и установлен на минимальном расстоянии от задней поверхности твердого носителя исследуемого образца в пределах от 0,01 до 10мм.

4. Устройство по п.3, отличающееся тем, что лицевая поверхность первого экрана снабжена отражающим или световозвращающим слоем.

5. Устройство по п.3, отличающееся тем, что узел крепления держателя твердого носителя образца обеспечивает возможность установки первого экрана первой группы за задней поверхностью твердого носителя и возможность его выведения из поля зрения АВ.

6. Устройство по п.1, отличающееся тем, что второй экран первой группы размещен относительно задней поверхности (43) твердого носителя образца на расстоянии, превышающем расстояние (19) от точки пересечения нижних границ

(22а, 22б) световых потоков и боковых границ оптического конуса (18) регистрирующей системы.

7. Устройство по п.6, отличающееся тем, что лицевая поверхность второго экрана первой группы, снабжена светопоглощающим слоем.

5 8. Устройство по п.1, отличающееся тем, что третий экран первой группы размещен за вторым экраном первой группы.

9. Устройство по п.8, отличающееся тем, что лицевая поверхность третьего экрана выполнена в виде светорассеивающей поверхности.

10 10. Устройство по п.8, отличающееся тем, что дополнительно содержит узел крепления второго и третьего экранов первой группы и обеспечивает возможность выведения второго экрана из зоны оптического конуса регистрирующей системы.

11. Устройство по п.1, отличающееся тем, что дополнительно содержит, по меньшей мере, один третий источник света.

15 12. Устройство по п.11, отличающееся тем, что третий источник света освещает лицевую поверхность третьего экрана или торцевые поверхности третьего экрана или заднюю поверхность третьего экрана.

20 13. Устройство по п.1, отличающееся тем, что дополнительно содержит узлы крепления первых и вторых экранов второй группы, которые обеспечивают возможность введения и выведения экранов из траектории оптических осей осветителей.

25 14. Устройство по п. 13, отличающееся тем, что узел крепления первого и второго экранов второй группы выполнен с использованием шарнирного соединения между узлом крепления и экраном и обеспечивает возможность поворота экранов относительно оптической оси осветителя.

15. Устройство по п.1, отличающееся тем, что первые экраны второй группы экранов снабжены светоотражающим слоем, а вторые экраны второй группы экранов снабжены световозвращающей поверхностью.

30 16. Устройство по п.1, отличающееся тем, что дополнительно содержит третьи экраны второй группы, которые размещены за первыми и вторыми экранами второй группы, причем лицевая поверхность третьих экранов снабжена поглощающим слоем.

17. Устройство по п.1, отличающееся тем, что экран представляет собой планарный лист, уголкового, цилиндрического или параболического элемента,

снабженный отражающей, светопоглощающей или световозвращающей поверхностью.

18. Устройство по п. 17, отличающееся тем, что световозвращающая поверхность выполнена в виде слоя шариков, зубцов треугольной или пирамидальной формы или частиц с высокой отражающей поверхностью.

19. Устройство по п.18, отличающееся тем, что световозвращающая поверхность выполнена на основе многослойных покрытий установленных на лицевой плоскости экрана с использованием клея.

20. Устройство по п. 17, отличающееся тем, что светопоглощающая поверхность экрана выполнена на основе абсорбирующего материала, входящего в группу, состоящую из пленок, формируемых химическим способом, композиции, включающей носитель и диспергированный пигмент, полимерных покрытий, снабженных клеящим слоем.

21. Устройство по п. 1, отличающееся тем, что свет от источников излучения падает на рабочую поверхность исследуемого образца под углом α к оптической оси регистрирующей системы в диапазоне от 40 до 60 градусов.

22. Устройство по п. 21, отличающееся тем, что источник света содержит светоизлучающие диоды, которые формируют световой поток, границы которого представлены в виде круга, овала, прямоугольника, квадрата, многоугольника, треугольника.

23. Устройство по п. 22, отличающееся тем, что источник света выполнен на основе гексогонально размещенных светодиодов, расположенных на расстоянии от 1,0 мм до 5 мм от лицевой поверхности осветителя,

24. Устройство по п.21, отличающееся тем, что источник света выполнен с возможностью смены осветителя.

25. Устройство по п.21, отличающееся тем, что источник света дополнительно содержит светопоглощающее покрытие, которое нанесено на поверхность держателей, содержащих цилиндрические отверстия, в глубине которых закреплены светодиоды и светопоглощающие элементы, которые размещены на поверхности кожуха осветителя.

26. Устройство по п. 25, отличающееся тем, что светопоглощающие элементы выполнены в виде планарной, вогнутой, цилиндрической или параболической формы.

27. Устройство по п. 22, отличающееся тем, что источник света генерирует излучение в диапазоне от 300 до 800 нм.

28. Устройство по п. 27, отличающееся тем, что источник света выполнен из светоизлучающих диодов, излучающих одинаковую длину волны.

5 29. Устройство по п.1, отличающееся тем, что твердый носитель исследуемого образца выполнен в виде биочипа, ячейки, кюветы, микроплаты.

30. Устройство по п. 1, отличающееся тем, что исследуемый объект представляет собой биологический образец, иммобилизованный на твердой планарной основе, образец, размещенный внутри объема проточной ячейки, 10 образец, размещенный внутри гибридизационного объема, образец, нанесенный на гибкой основе, приклеенной к твердой планарной основе, образец, иммобилизованный в гелевой основе, образец, связанный с хроматографическим носителем.

31. Устройство по п. 30, отличающееся тем, что биологический образец 15 выбирают из группы, состоящей из ДНК, белков, ферментов, антител, антигенов, клеток.

32. Устройство по п. 30, отличающееся тем, что биологический образец снабжен маркером, который является флуорофором, колориметрической меткой или хемилюминесцентной меткой.

20 33. Способ проведения диагностических тестов посредством освещения образца, иммобилизованного на твердой основе или размещенного в реакционном объеме, отличающийся тем, что:

а) выбирают режим диагностики из группы, включающей измерение флуоресценции, люминесценции, рассеяния или пропускания света,

25 б) поочередно вводят в траекторию оптических осей осветителей и/или в траекторию оптической оси регистрирующей системы один или несколько экранов,

в) помещают объект исследования в держатель образца и вводят его в траекторию оптических осей осветителей и регистрирующей системы,

30 г) по предварительному изображению на дисплее подбирают условия съемки и запоминают первое изображение,

д) выводят объект из траекторий оптических осей осветителей и регистрирующей системы,

е) запоминают второе изображение,

ж) формируют разностное изображение между первым и вторым изображением,

з) попиксельно умножают разностное изображение на нормировочные коэффициенты и запускают программу обработки полученного изображения.

5 34. Способ по п. 33 отличающийся тем, что для измерения флюоресценции или люминесценции используют первый экран первой группы, который устанавливают в держатель образца.

10 35. Способ по п. 33 отличающийся тем, что для измерения флюоресценции или люминесценции используют второй экран первой группы в комбинации с первыми или вторыми экранами второй группы.

36. Способ по п. 33 отличающийся тем, что для измерения флюоресценции или люминесценции используют второй экран первой группы в комбинации с третьими экранами второй группы.

15 37. Способ по п. 33 отличающийся тем, что для измерения пропускания или рассеяния используют третий экран первой группы в комбинации с третьими экранами второй группы.

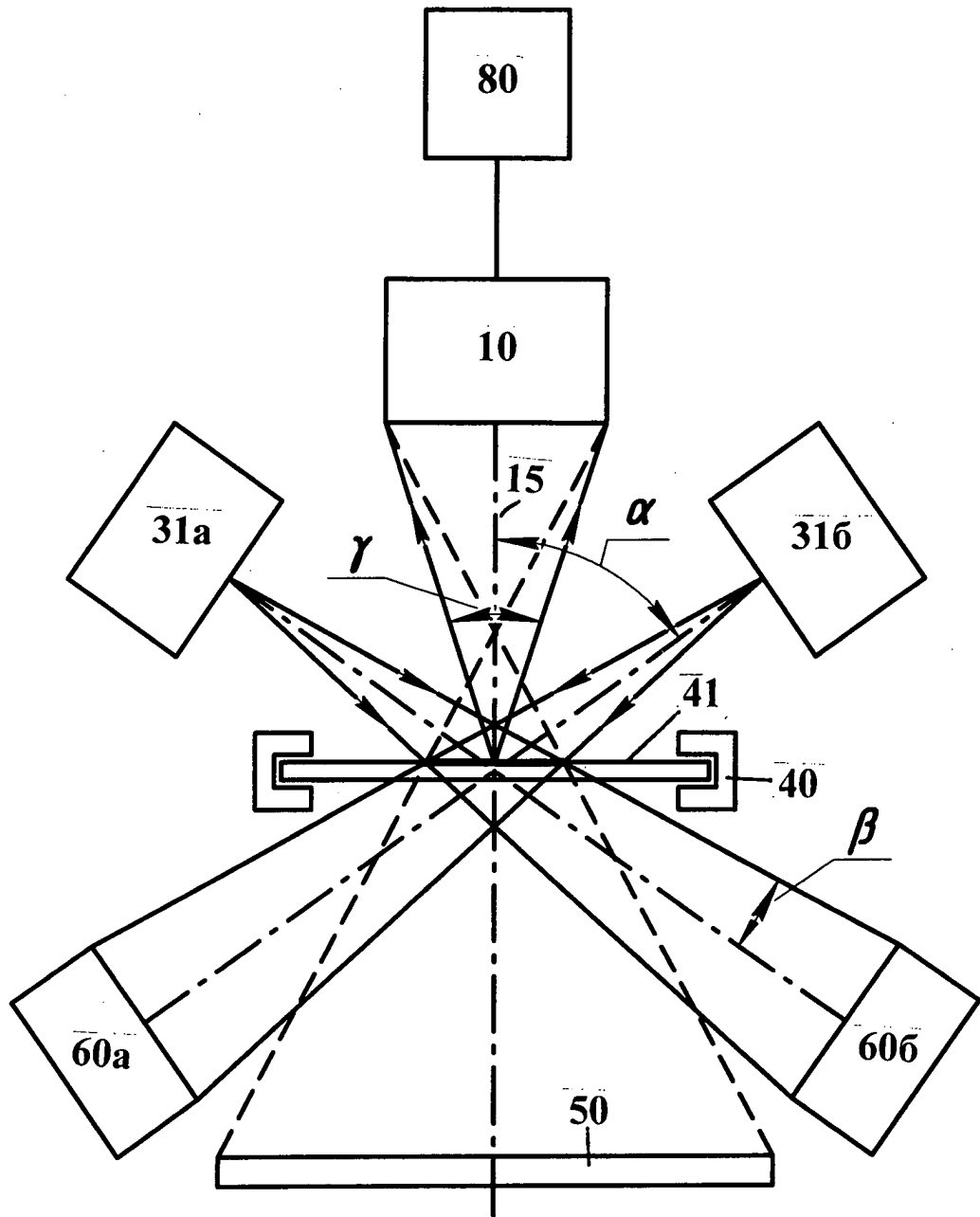
38. Способ по п. 33 отличающийся тем, что в качестве эталонного объекта для расчета нормировочного коэффициента используют прозрачный однородно флуоресцирующий по площади слой.

20 39. Способ по п. 38 отличающийся тем, что флуоресцирующий слой выполнен из пленки закрепленной на носителе выполненного из пластика, оптического стекла или кварца.

25 40. Способ по п. 38 отличающийся тем, что флуоресцирующий слой выполнен из тонкой плоскопараллельной пластины цветного флуоресцирующего оптического стекла.

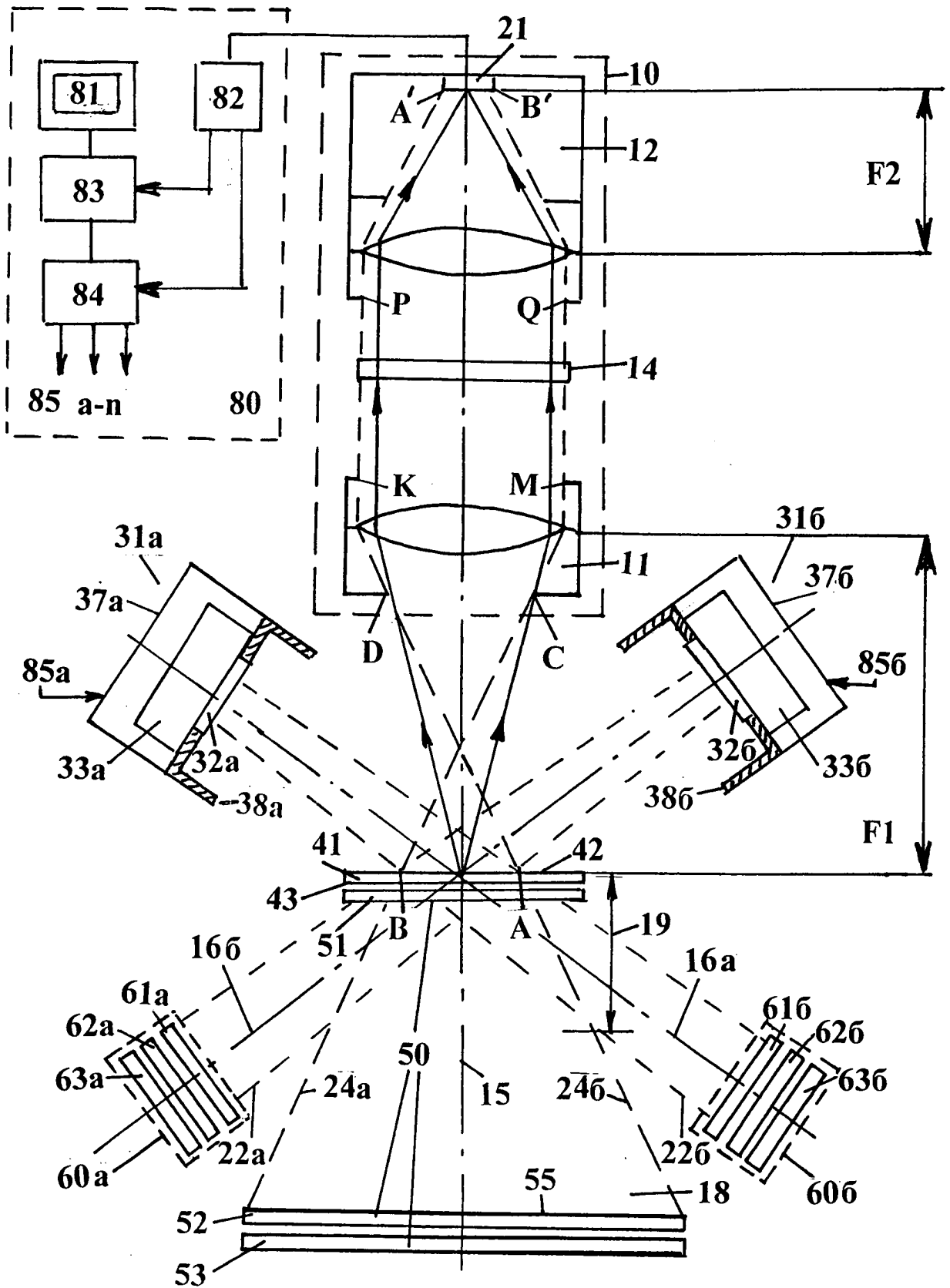
41. Способ по п. 38 отличающийся тем, что флуоресцирующий слой выполнен из жидкости, содержащий флуоресцирующие молекулы, и находящийся между двумя строго параллельными прозрачными не флуоресцирующими пластинами.

30 42. Способ по п. 38 отличающийся тем, что флуоресцирующий слой выполнен из флуорохрома, иммобилизованного на поверхности прозрачной не флуоресцирующей пластины.

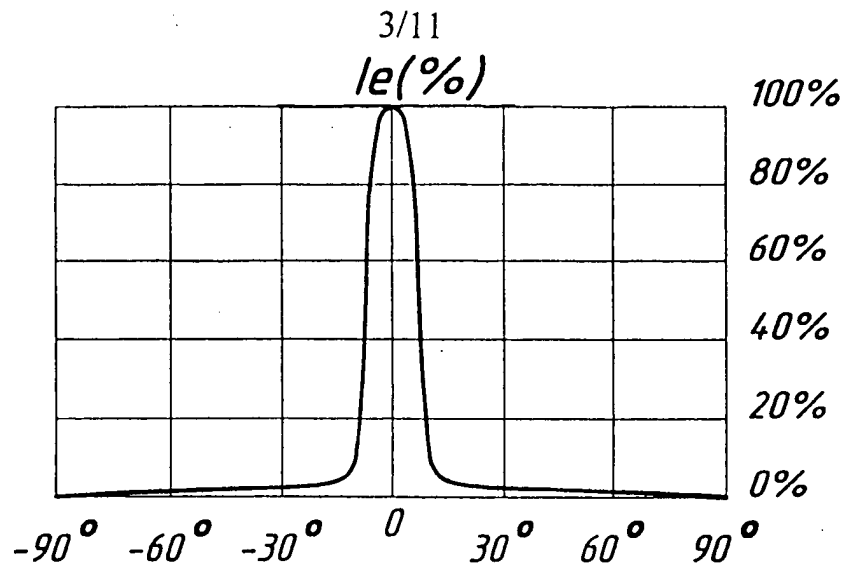


Фиг. 1

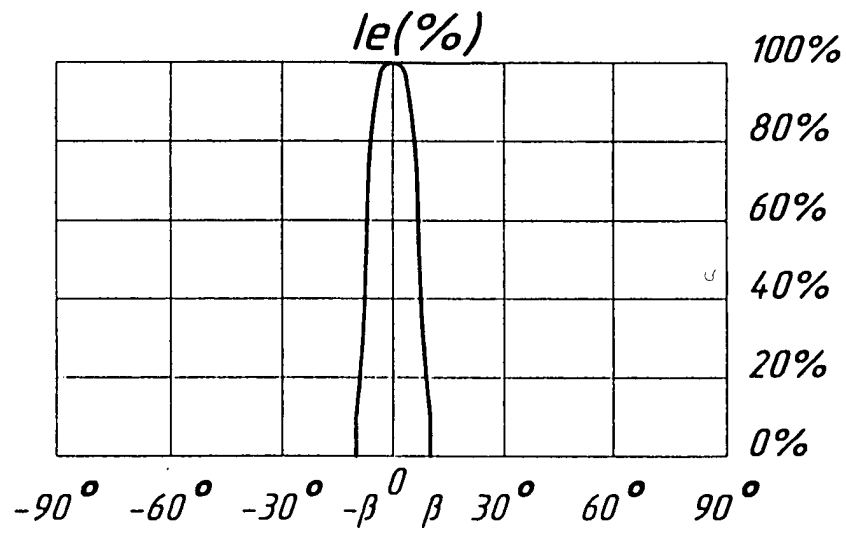
2/11



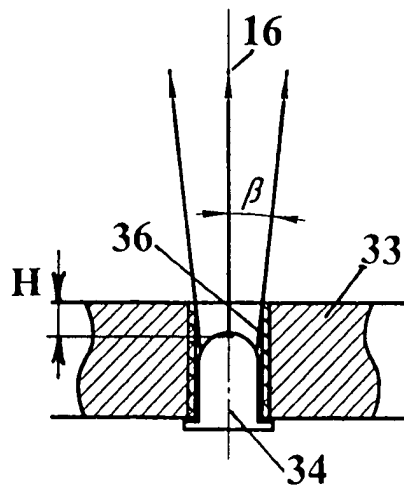
Фиг. 2



a)

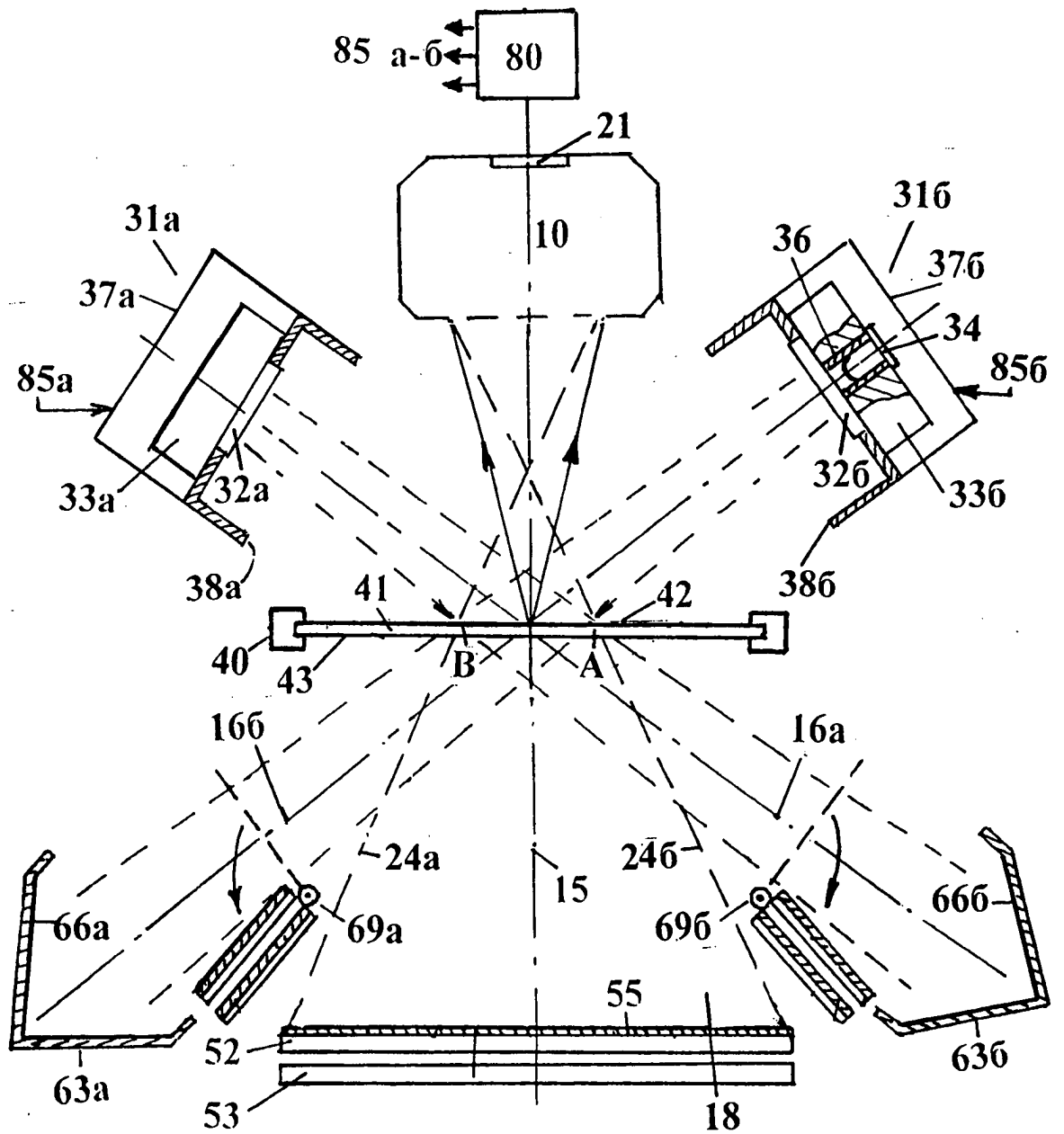


б)

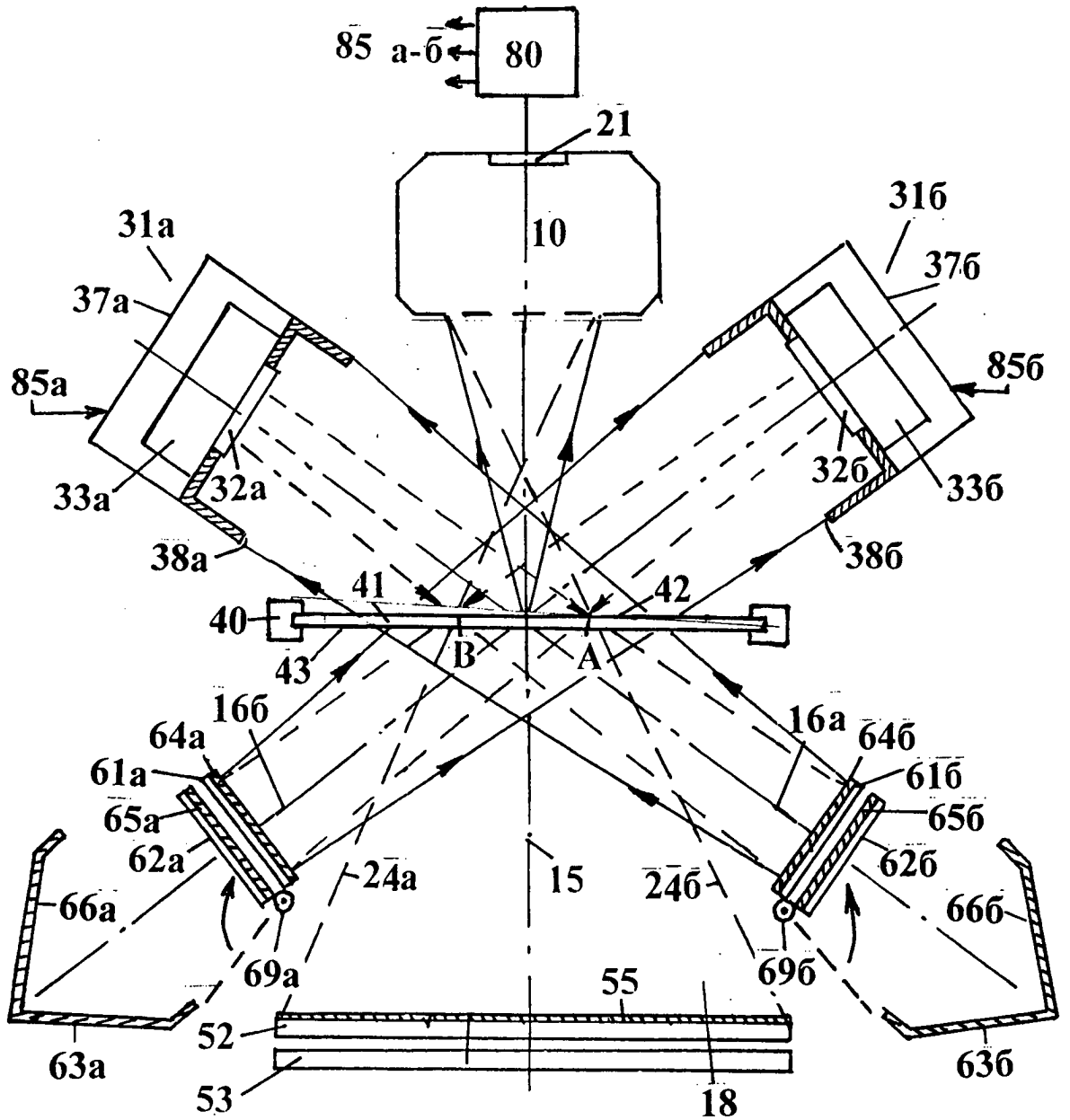


в)

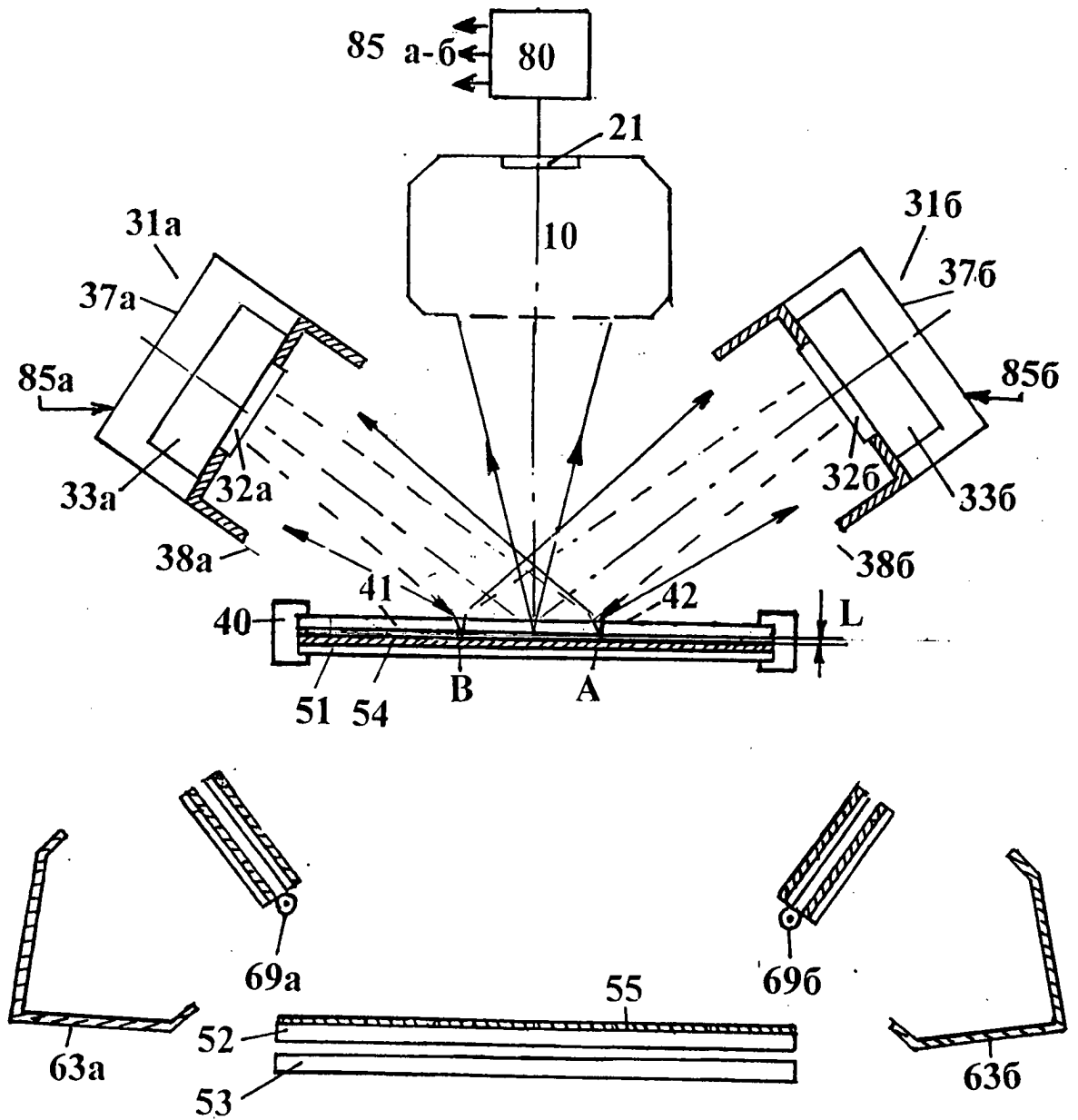
Фиг. 3



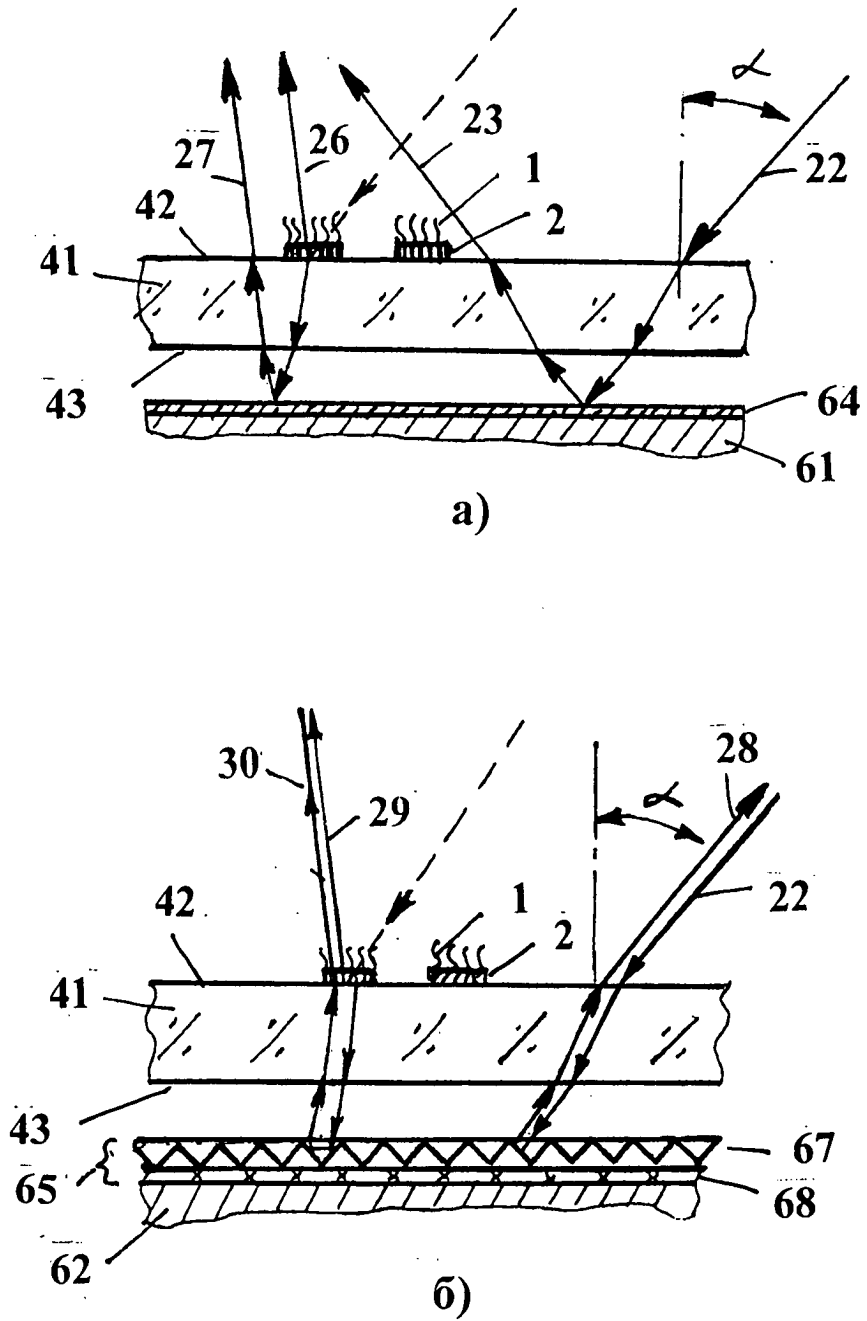
Фиг. 4



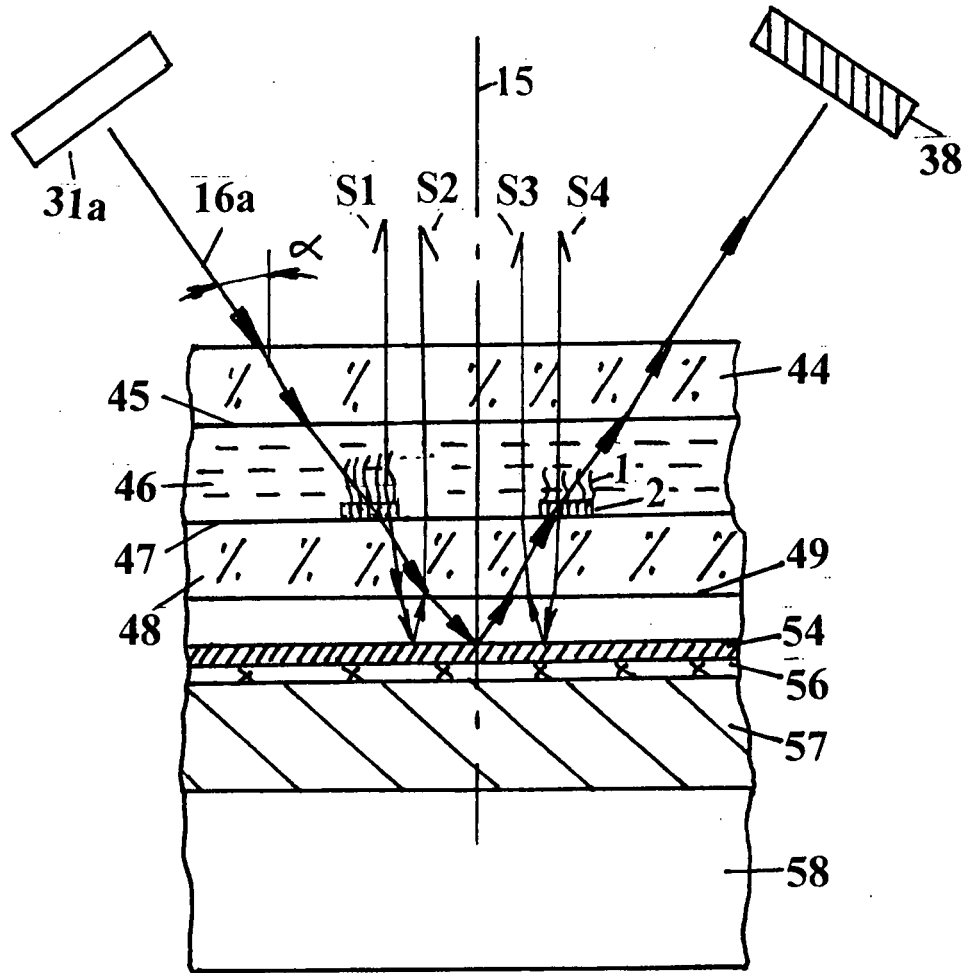
Фиг. 5



Фиг. 6

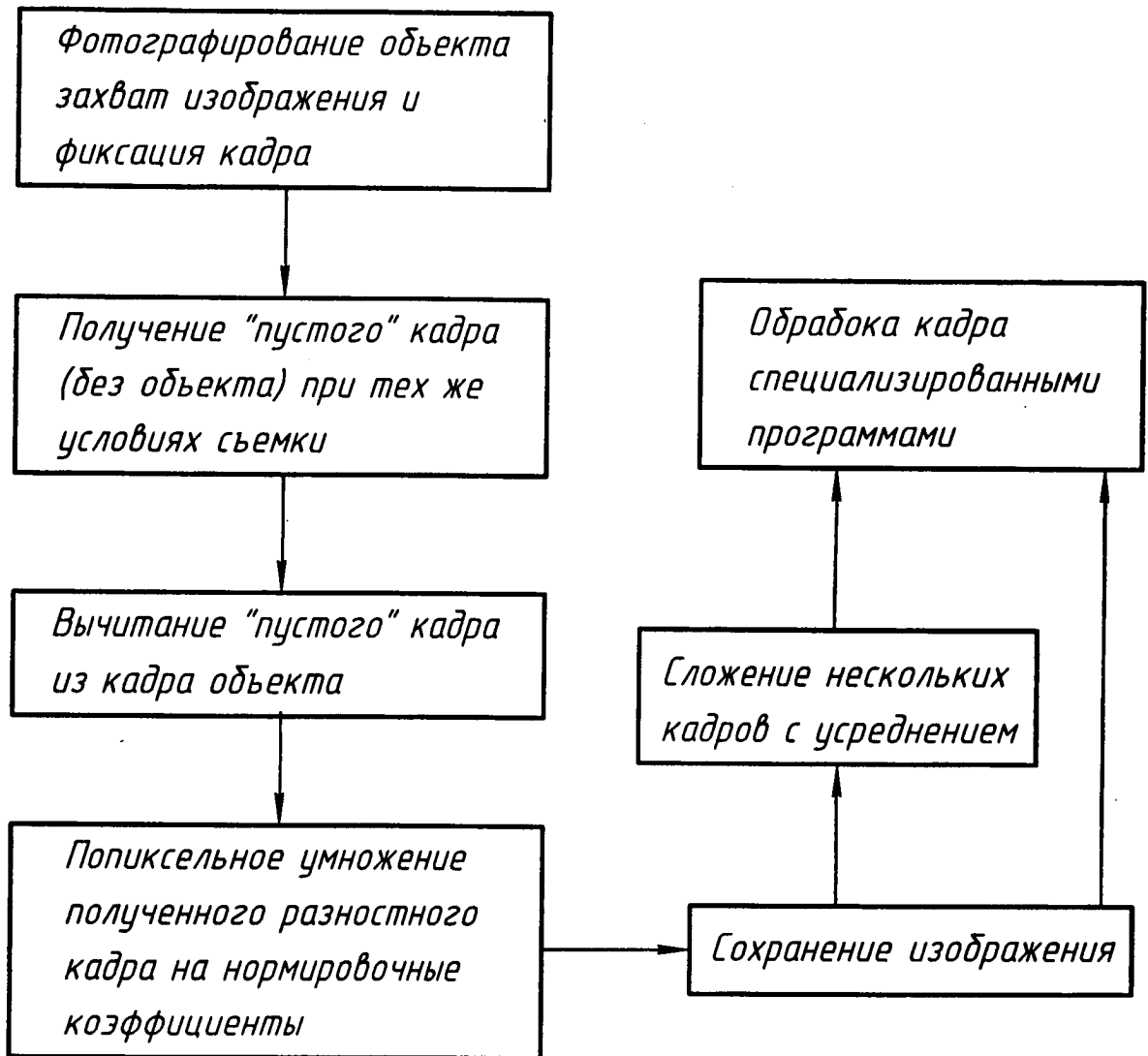


Фиг. 7



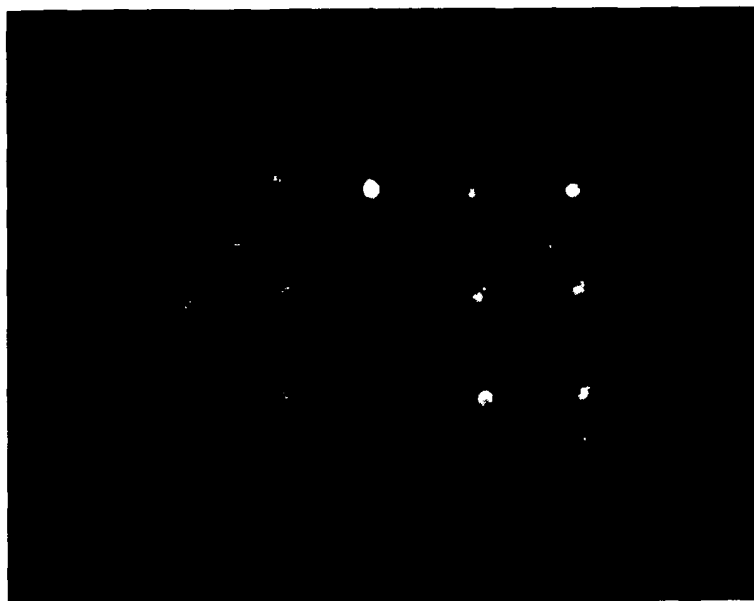
Фиг. 9

10/11

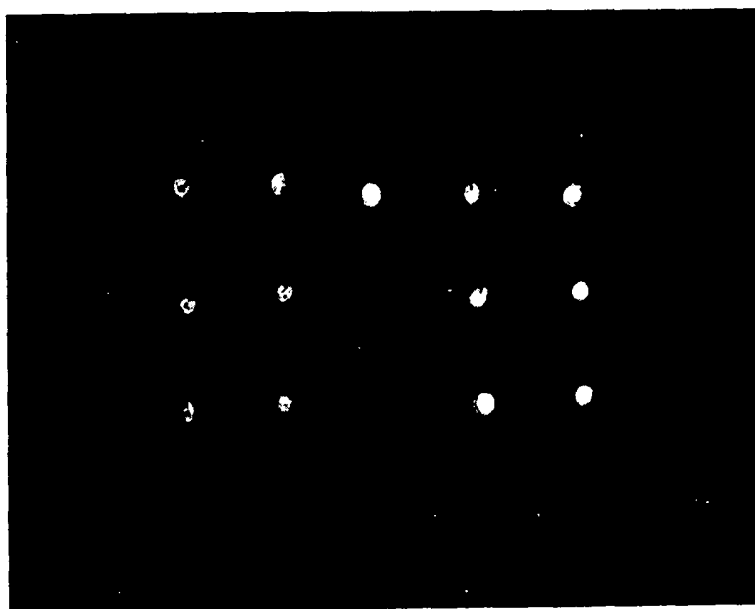


Фиг. 10

11/11



a)



б)

Фиг. 11