

ОПТИЧЕСКОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ И ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 535.3+543.426

ОБЪЕКТИВЫ ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ФРАГМЕНТОВ ДНК

© 2004 г. А. П. Грамматин, доктор техн. наук; Е. А. Демидова

Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики.
Санкт-Петербург

Рассмотрены оптические схемы линзовых и зеркально-линзовых специальных объективов с увеличениями $1^{\times}$ – $1.7^{\times}$ и числовыми апертурами 0.35–0.5, которые входят в состав люминесцентных анализаторов изображений, предназначенных для исследования фрагментов ДНК в диагностических целях.

Коды OCIS: 080.3630, 170.4580.

Поступила в редакцию 16.09.2003.

В середине последнего десятилетия XX века в рамках российской программы "Геном человека" в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН под руководством академика А.Д. Мирзабекова был разработан метод анализа ДНК, предназначенный для обнаружения болезнетворных бактерий и вирусов, находящихся в окружающей среде или в крови, слюне и других образцах, взятых у пациентов. Метод основан на возбуждении люминесценции в ячейках биочипа, содержащих смеси особых реактивов с исследуемым материалом.

Биочип представляет собой предметное стекло от биологического микроскопа, на поверхности которого расположены квадратные ячейки, заполненные гелем, содержащим особый реактив (например, ДНК болезнетворных бактерий или вирусов). Сторона квадрата ячейки составляет 0,1 мм, а расстояние между ближайшими сторонами соседних ячеек 0,2 мм. Необходимое количество ячеек обычно не превышает 500, что определяет размеры рабочего поля объектива, изображающего биочип на светочувствительную поверхность ПЗС-матрицы. Таким образом, объектив должен иметь прямоугольное поле, соотношение сторон которого определяется соотношением сторон матрицы (обычно 3:4), а диагональ равна 5–10 мм.

На поверхность чипа наносят исследуемый материал (например, кровь, слюну или другие образцы, взятые у больного), который под воздействием излучения полупроводниковых лазеров начинает люминесцировать. Интенсивность люминесценции служит показателем наличия той или иной болезни у пациента.

Экспериментальным путем было установлено, что при использовании высокочувствительных охлаждаемых ПЗС-матриц наименьшая выходная числовая

апертура объектива должна составлять примерно 0.3. Линейное увеличение объектива зависит от размера пиксела (30×30 – 50×50 мкм) и определяется из условия, что изображение одной ячейки занимает не менее 9 пикселей. Таким образом, линейное увеличение объектива должно находиться в пределах 1–1.7. Итак, объективы для люминесцентного анализа биочипов должны обладать уникальным сочетанием увеличения, линейного поля и числовой апертуры, не свойственным традиционным оптическим системам. Однако в качестве тривиального решения проблемы может использоваться система, состоящая из двух одинаковых светосильных фотографических объективов, установленных таким образом, чтобы между ними был создан параллельный ход апертурных лучей. Очевидно, что линейное увеличение такой системы равно –1. Диафрагменное число каждого из объективов должно быть не более 1.67, что обеспечивает выходную числовую апертуру не менее 0.3. Например, для этой цели пригоден объектив фирмы "Zeiss" Planar T/f/1.4–50 mm [1] с выходной числовой апертурой 0.35. Но такое решение нельзя считать оптимальным, поскольку в этой схеме используется лишь незначительная часть коррегированного поля изображения фотографического объектива, равного 43 мм в диаметре, а число линз составляет 14. По аналогичному принципу рассчитан оригинальный объектив 1×0.35 с полем диаметром 10 мм (рис. 1), содержащий 10 линз. Сравнительная простота конструкции достигнута здесь вследствие отсутствия необходимости в самостоятельной коррекции аберраций отдельных половинок объектива и благодаря узкой области спектра, ограниченной пропусканием интерференционного светофильтра, препятствующего попаданию на приемник возбуждающего люминесценцию излучения.

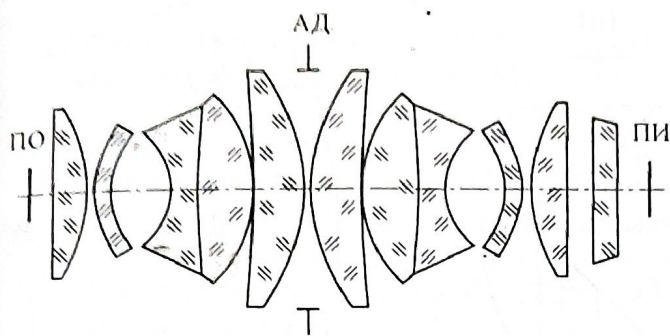


Рис. 1. Принципиальная оптическая схема линзового объектива $1 \times 0,35$. ПО – плоскость объекта, АД – апертурная диафрагма, ПИ – плоскость изображения.

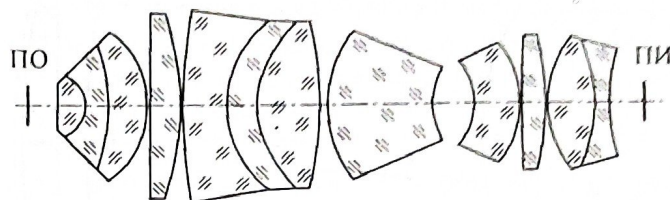


Рис. 2. Принципиальная оптическая схема линзового объектива $1,6 \times 0,5$. ПО – плоскость объекта, ПИ – плоскость изображения.

Разработанные в 90-х годах объективы для люминесцентных анализаторов изображений, приведенные в статье [2], базировались на схемах объективов микроскопа, причем возбуждающий люминесценцию световой пучок от ртутной лампы вводился с помощью спектроделительной пластины, расположенной между линзами объектива в параллельном пучке лучей. При использовании в качестве источника света полупроводникового лазера подсветка может быть осуществлена непосредственно, минуя объектив, без осветительной системы. Однако при этом необходимо обеспечить достаточно большое рабочее расстояние объектива. На рис. 2 приведена оптическая схема объектива $1,6 \times 0,5$ с использованием лазерного возбуждения люминесценции. Первые четыре компонента представляют собой планохроматический объектив микроскопа, а три последние подобны по конструкции окуляру зрительной трубы. Линейное поле объектива равно 5 мм, а рабочее расстояние составляет 3 мм. Обратим внимание, что обычный планохроматический объектив микроскопа с числовой апертурой 0,5 имеет линейное поле порядка 1,2 мм, а рабочее расстояние – не более 1 мм.

Принципиально новым конструктивным решением объективов с однократным увеличением для анализа биочипов стало использование объектива “Микронар” [3, 4] (рис. 3), базовым элементом которого является сферическое зеркало, работающее в режиме автоколлимации при линейном увеличении -1 , когда плоскости предмета и изображения совпадают, а апертурной диафрагмой служит оправа зеркала. В этом случае зеркало вносит только меридиональную составляющую астигматизма. Остальные aberrации отсутствуют. Устранение указанной aberrации может быть достигнуто с помощью плосковыпуклой линзы, сферическая поверхность которой концентрична поверхности зеркала, задний фокус находится на его вершине, а толщина равна по абсолютной величине радиусу. Тогда преломляющие и отражающие поверхности образуют концентричную афокальную систему, что, как показано в работе

[5], обеспечивает устранение меридиональной составляющей астигматизма третьего порядка. Поскольку плоскости предмета и изображения при этом совпадают с плоской поверхностью линзы, то такая система остается безабберационной и для осевой точки предмета. Хроматизм увеличения и дисторсия устраняются за счет симметрии хода главных лучей. Существенным недостатком такой системы является отсутствие рабочих расстояний как со стороны предмета, так и со стороны изображения. Необходимость большого рабочего расстояния со стороны предмета, как отмечалось выше, связана с реализацией непосредственной подсветки биочипа с помощью полупроводникового лазера. Рабочее расстояние со стороны изображения определяется конструкцией ПЗС-камеры. Так, для охлаждаемых камер, где защитное стекло находится на довольно большом расстоянии от матрицы, расстояние от последней поверхности объектива до плоскости матрицы должно составлять 15–20 мм.

Если в рассмотренной выше конструкции объектива уменьшить толщину плосковыпуклой линзы, как бы отрезав от нее плоскопараллельную пластинку и переместив соответственно совмещенные плоскости предмета и изображения, то благодаря телецентрическому ходу главных лучей как в пространстве предметов, так и в пространстве изобра-

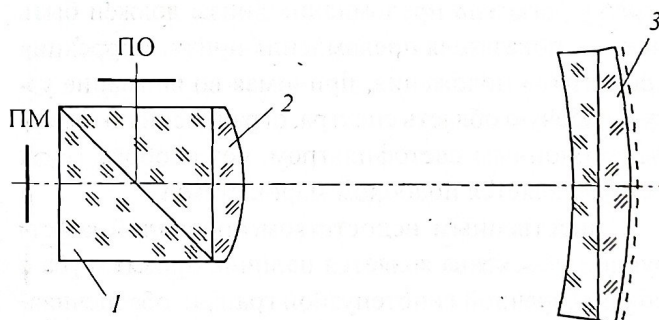


Рис. 3. Принципиальная оптическая схема объектива “МИКРОНАР”. ПО – плоскость объекта, 1 – призма-куб с полупрозрачным слоем, 2 – линза, 3 – компонент, ПМ – плоскость ПЗС-матрицы.

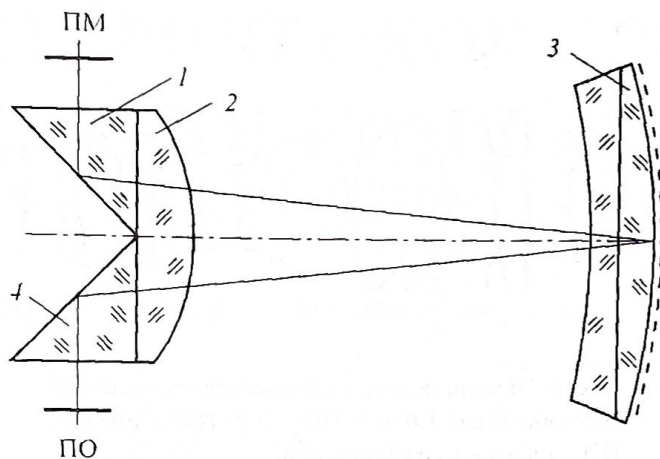


Рис. 4. Принципиальная оптическая схема зеркально-линзового объектива $1\times 0,35$. ПО – плоскость объекта; 1, 4 – прямоугольные призмы; 2 – линза, 3 – компонент, ПМ – плоскость ПЗС-матрицы.

жений появятся только сферическая aberrация и хроматизм положения. Для их компенсации можно установить вблизи от вершины зеркала тонкий двухлинзовый афокальный компонент, обладающий, как известно [6], произвольным значением основного параметра P и, следовательно, позволяющий устранить сферическую aberrацию. Хроматизм положения может быть компенсирован путем подбора марок стекол. Астигматизм этого компонента практически отсутствует благодаря близкому расположению апертурной диафрагмы. Кома объектива автоматически устраняется за счет симметрии самого объектива и симметричного хода лучей в нем. Для уменьшения количества поверхностей, граничащих с воздухом, компенсационный компонент можно выполнить склеенным из двух линз с последней зеркальной поверхностью, т. е. совместить компенсатор с зеркалом. Дополнительное увеличение рабочих расстояний может быть достигнуто, если призму 1 и линзу 2 (рис. 3) выполнить из различных марок стекол. Тогда на поверхностях склейки призм и линзы возникает сферическая aberrация, которая компенсирует сферическую aberrацию, возникшую на первой и последней поверхностях объектива. Для этого показатель преломления линзы должен быть меньше показателя преломления призм. Коррекция хроматизма положения, принимая во внимание узкую рабочую область спектра, ограниченную интерференционным светофильтром, без особого труда осуществляется подбором марок стекол.

Существенным недостатком описанной конструкции объектива является наличие призмы-куба с полупрозрачной гипотенузной гранью, обеспечивающей разделение плоскостей предмета и изображения, в результате чего потери света достигают 80%.

Для устранения этого дефекта призма-куб заменяется двумя прямоугольными призмами 1, 4 (рис. 4),

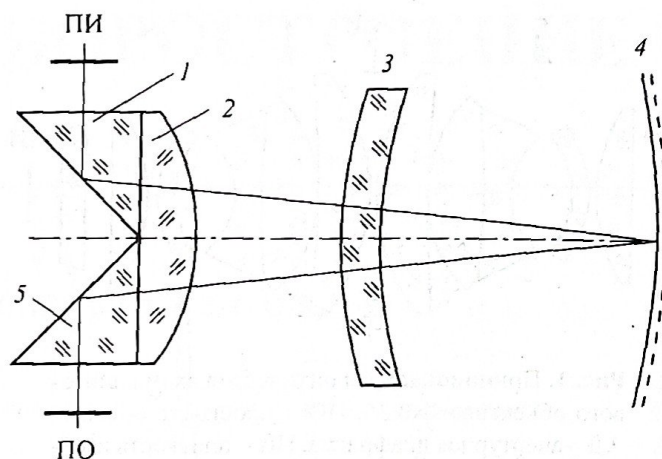


Рис. 5. Принципиальная оптическая схема зеркально-линзового объектива $1\times 0,35$. ПО – плоскость объекта; 1, 5 – прямоугольные призмы, 2 – линза, 3 – мениск, 4 – зеркало, ПИ – плоскость изображения.

осуществляющими пространственное разделение плоскостей предмета и изображения путем выделения из круглого поля изображения кольцевого сектора.

Представленный на рис. 4 объектив обладает рабочими расстояниями в пространствах предмета и изображения по 22 мм, числовой апертурой 0,35 и прямоугольным полем с размерами $6,5\times 8,7$ мм.

На рис. 5 представлен упрощенный вариант объектива, где в качестве компенсатора сферической aberrации использована менисковая линза 3. Первая поверхность этой линзы является концентричной зрачку, т. е. свободной от астигматизма. Радиус кривизмы равен радиусу первой, что обеспечивает устранение кривизны изображения. Толщина линзы является параметром, обеспечивающим устранение сферической aberrации. Рабочие расстояния равны по 20 мм, числовая апертура составляет 0,35, поле – прямоугольник 12×18 мм.

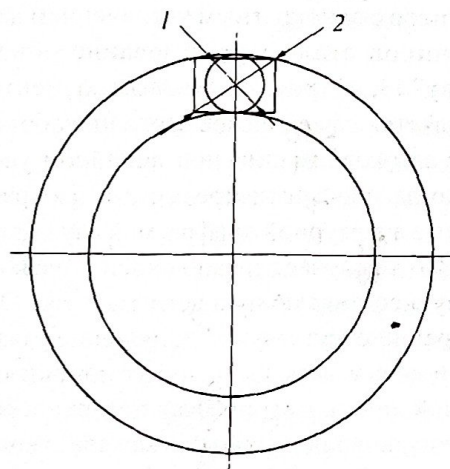


Рис. 6. Поле в зеркально-линзовом объективе. 1 – диаметр круглого поля, 2 – диагональ прямоугольного поля.

Одним из существенных преимуществ зеркально-линзового объектива рассмотренного типа является возможность использования прямоугольных полей, существенно больших по площади, чем круговые поля. Например, в объективе, представленном на рис. 5, диаметр поля равен 14 мм, а диагональ прямоугольного поля составляет 21,6 мм. Соответствующие площади равны 154 и 216 мм². Сказанное поясняет рис. 6.

По сравнению с линзовыми представленными зеркально-линзовые объективы содержат всего лишь по пять оптических элементов, обладают лучшим светопропусканием и являются более технологичными, поскольку менее чувствительны к погрешностям изготовления.

ЛИТЕРАТУРА

1. http://www.foto.ru/quick_catalog/lens.htm
2. Барский И.Я., Грамматин А.П. и др. Широкопольные люминесцентные микроскопы для анализа биологических микрочипов // Оптический журнал. 1998. Т. 65. № 11. С. 83–87.
3. Грамматин А.П., Ларина Р.М., Горбунова В.А. Объективы для проекционной фотолитографии // ОМП. 1976. № 11. С. 60–69.
4. Грамматин А.П. Автоколлимационный объектив // А. с. № 396662. Бюл. изобр. 1973. № 36. С. 103.
5. Грамматин А.П. Некоторые свойства концентрических оптических систем // ОМП. 1971. № 4. С. 26.
6. Слюсарев Г.Г. Методы расчета оптических систем. Л.: Машиностроение, 1969. 670 с.