

УДК 535.42

ДИФРАКЦИОННЫЙ ФОКУСИРУЮЩИЙ МУЛЬТИПЛИКАТОР ДЛЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО МНОГОКАНАЛЬНОГО СЕКВЕНАТОРА*

В. П. Бессмельцев¹, П. С. Завьялов², В. П. Корольков¹,
Р. К. Насыров¹, В. С. Терентьев¹

¹Институт автоматики и электрометрии СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1

²Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН,
630058, г. Новосибирск, ул. Русская, 41
E-mail: bessmelt@iae.nsk.su

Рассмотрены вопросы создания и применения для задач ДНК-секвенирования и микроскопии дифракционных оптических элементов, формирующих из одного лазерного пучка с малой расходимостью матрицу сходящихся пучков с дифракционным размером сфокусированных пятен в плоскости освещения объекта. Расчёт и оптимизация параметров элементов выполнялись в приближении теории дифракции Френеля — Кирхгофа. Дифракционные элементы изготавливались методом прямой лазерной записи на фоторезисте с помощью круговой лазерной записывающей системы. Представлены экспериментальные характеристики дифракционного элемента, создающего матрицу размера 33×33 пучка, которые фокусируются на расстоянии 210 мм в одной плоскости. Степень неоднородности интенсивностей пучков, определяемая отношением интенсивностей пучков в центральной области к интенсивностям периферийных пучков, составляет 1/2,5, что потенциально достаточно для использования в задачах ДНК-секвенирования. При этом величина максимальных дисторсионных искажений положений пятен на всём поле области фокусировки $< 0,15$ %.

Ключевые слова: дифракционный оптический элемент, фокусирующий дифракционный мультипликатор, параллельный секвенатор, прямая лазерная запись на фоторезисте.

DOI: 10.15372/AUT20170505

Введение. Одним из методов увеличения производительности оптических систем записи и оптико-электронных устройств сбора и обработки информации является распараллеливание процессов обработки (записи) за счёт применения мультиплицирования изображений или световых лучей. В настоящее время базовой технологией создания оптического мультипликатора принята технология, основанная на формировании модуля, содержащего дифракционный элемент в связке с фокусирующим рефракционным элементом (линзой) [1, 2]. Однако такой модуль может внести большие геометрические искажения в оптическую схему системы из-за собственных аберраций линзы и ошибок взаимной ориентации дифракционного элемента и линзы в пространстве (наклон, смещение).

Основой технологии секвенирования ДНК, разрабатываемой сотрудниками институтов Сибирского отделения РАН, является принцип параллельного секвенирования методом одномолекулярных реакций в нанореакторах. Нанореакторы диаметром 80–100 нм сформированы в слое алюминия толщиной 70–100 нм, нанесённого на кварцевую подложку, и сгруппированы на подложке на определённом расстоянии друг от друга в виде матрицы. На рис. 1, а дано изображение чипа (25×25 наноотверстий, расположенных эквидистантно) на просвет в белом свете. Количество рядов отверстий может быть различным, ограни-

*Работа выполнена при финансовой поддержке Сибирского отделения РАН (комплексная программа фундаментальных исследований № П.2П/П.10-8).

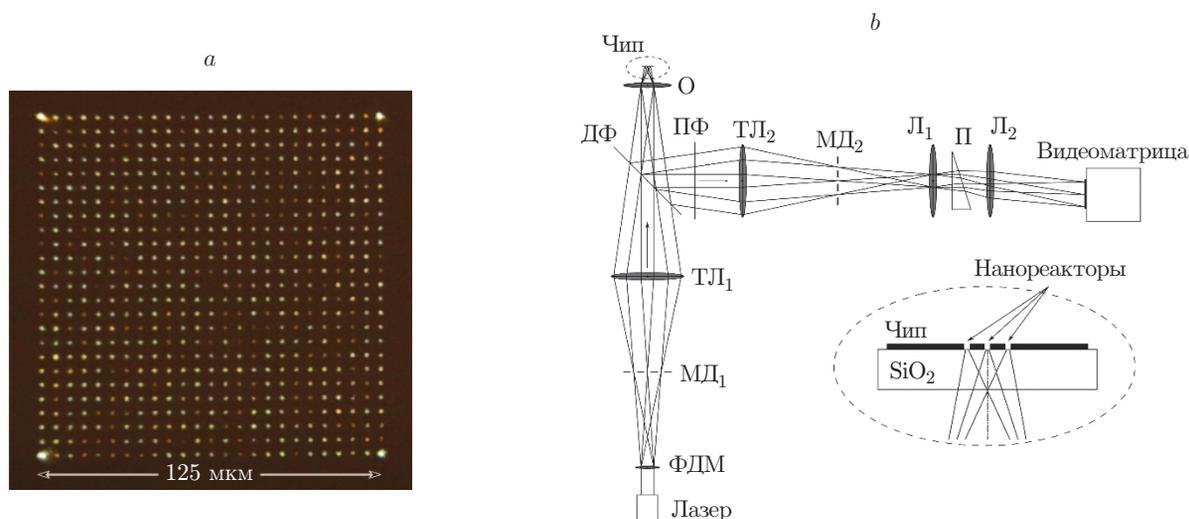


Рис. 1. Осветительная схема: *a* — микрофотография рабочей зоны чипа размером 125 мкм при освещении на просвет (диаметр нанореактора 70–110 нм, *b* — структура схемы (подложка — кварц)

чение в их числе связано с разрешающей способностью видеоматрицы в измерительной схеме (рис. 1, *b*).

Такая структура эффективна для параллельного освещения и считывания с помощью матричных фотоприёмников световых вспышек, возникающих при реакции образования флуоресцирующих оснований в схеме многоканального ДНК-секвенатора фирмы Pacific Biosciences [3, 4]. В каждом нанотверстии находится несколько типов флуорофоров, которыми помечены четыре типа нуклеотидов. Свет флуоресценции даёт информацию о типе нуклеотида, вступающего в реакцию в данный момент времени и синтезирующего ДНК-молекулу. Для оптимального освещения матрицы нанореакторов возбуждающим излучением разработана оптическая схема (см. рис. 1, *b*), формирующая матрицу лазерных пучков, точно совпадающих геометрически с матрицей нанореакторов в фокусе осветительной схемы. При размере чипа 125 мкм и шаге между нанореакторами 5 мкм ошибка при несовмещении матрицы освещающих лучей и матрицы нанореакторов 0,5 мкм приводит к полной потере работоспособности схемы.

Цель предложенной работы заключается в демонстрации методов расчёта, изготовления и тестирования свойств фокусирующего дифракционного мультипликатора (ФДМ), используемого в многоканальном ДНК-секвенаторе.

Оптическая схема блока формирования данных параллельного секвенатора.

Особенностью применённого решения является использование разработанного нами дифракционного элемента, совмещающего функции мультипликатора, формирующего матрицу размера 33×33 пучка, и фокусирующего элемента. В данной схеме (см. рис. 1, *b*) лазер (несколько лазеров) освещает ФДМ так, чтобы сформировать матрицу фокусирующихся пучков в плоскости матрицы диафрагм (МД₁). Далее с помощью тубусной линзы (ТЛ₁) и объектива (О) изображение из плоскости МД₁ переносится в объектную плоскость чипа, проходя при этом через дихроичный фильтр (ДФ), пропускающий лазерный свет. Пятна фокусировки осветительных пучков должны быть пространственно совмещены с соответствующими нанотверстиями, как показано на вставке. Испущенный флуорофорами свет затем попадает на видеоматрицу посредством аналогичной осветительной проекционной схемы, состоящей из тубусной линзы (ТЛ₂) матрицы диафрагм МД₂ и двух проекционных линз (Л₁ и Л₂). При этом для подавления паразитного лазерного света использован полосовой фильтр (ПФ), а для спектрального пространственного разделения — призма (П).

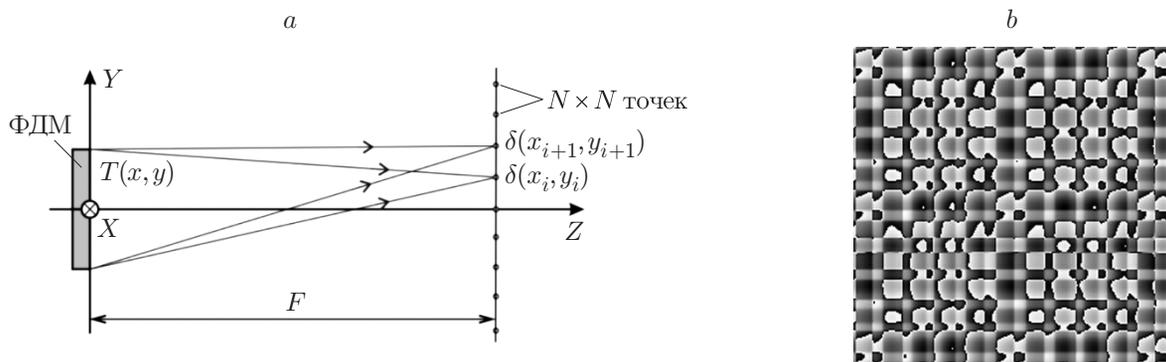


Рис. 2. Структура расчёта ФДМ: *a* — принципиальная схема расчёта, *b* — фазовый узор $\varphi(x, y)$ в виде полутонного рисунка

Расчёт фокусирующего дифракционного мультипликатора производился в скалярном приближении теории дифракции Кирхгофа — Френеля [5]. Если принять, что световое поле, формируемое дифракционным оптическим элементом, представляет собой набор ярких точек, описываемых δ -функциями, то комплексную функцию пропускания ФДМ можно представить как суперпозицию $N \times N$ сферических волновых фронтов (рис. 2, *a*):

$$T(x, y) = \sum_{i=1}^{N^2} \sqrt{I_i} h(x, y, x_i, y_i), \quad (1)$$

$$h(x, y, x_i, y_i) = \frac{\exp |jkr(x, y, x_i, y_i)|}{j\lambda r(x, y, x_i, y_i)}, \quad (2)$$

$$r(x, y, x_i, y_i) = \sqrt{(x - x_i)^2 + (y - y_i)^2 + F^2}, \quad (3)$$

где $T(x, y)$ — функция пропускания ФДМ; I_i — относительная интенсивность i -го светового пучка; F — фокусное расстояние ФДМ; $h(x, y, x_i, y_i)$ — импульсный отклик свободного пространства (сферическая волна).

С использованием данной математической модели в специально созданной программе (язык программирования C++) были рассчитаны функции пропускания ФДМ, формирующего требуемую световую картину. При изготовлении ФДМ применялась фазовая компонента функции $T(x, y)$ (рис. 2, *b*):

$$\varphi(x, y) = \arg(T(x, y)). \quad (4)$$

Следует отметить, что такой прямой расчёт даёт существенную неравномерность яркости точек, которая может достигать значений 30–40 %, особенно при освещении узким гауссовым пучком. Необходимо применять итерационную процедуру расчёта (оптимизацию), в которой путём подбора значений I_i достигается бóльшая степень однородности (до 2–5 %).

Формулы (1)–(4) могут использоваться для оптимизации распределения интенсивности между пучками при произвольном амплитудно-фазовом профиле интенсивности в плоскости ФДМ. В частности, практически важной является оптимизация пучков с гауссовским профилем, определяемым полушириной поля на полувысоте w . На рис. 3, *a* приведены расчётные распределения интенсивностей формируемых точек при освещении ФДМ гауссовым пучком ($w = 6$ мм) без проведения процедуры оптимизации (СКО интенсивностей точек 33 %), а на рис. 3, *b* — распределения интенсивностей после 20 циклов оптимизации (СКО 3,7 %).

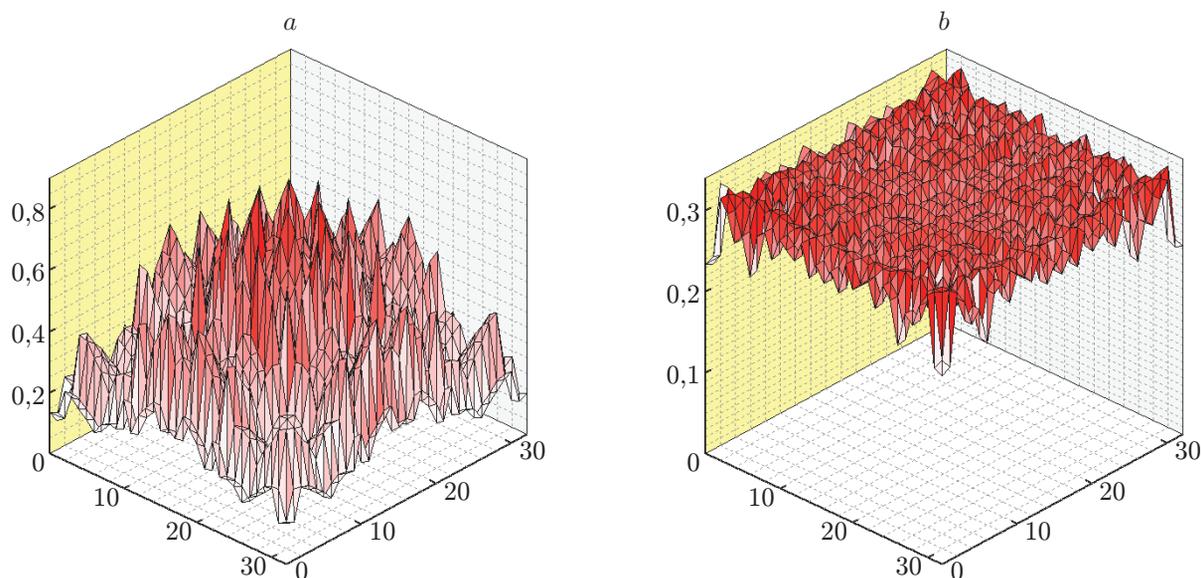


Рис. 3. Распределение интенсивностей точек: *a* — без оптимизации, *b* — с оптимизацией

Изготовление фокусирующего дифракционного мультипликатора. Первые варианты ФДМ изготовлены на базе амплитудной дифракционной структуры на плёнке хрома для длин волн 488, 532, 640 нм (25×25 пучков). Данные амплитудно-фазовые элементы имели сравнительно низкую полезную дифракционную эффективность ($< 15\%$), что обусловлено поглощением в металлическом слое. Затем сделан переход к бинарной фазовой структуре, основанной полностью на кварцевой дифракционной решётке. Эффективность была повышена до $\approx 40\%$. Однако у этих вариантов ФДМ обнаружено низкое качество пространственных характеристик распределения интенсивности каждого из пучков в области фокусировки (негауссово распределение). Максимального значения дифракционной эффективности ($\geq 90\%$), а также высокого качества пучков удалось добиться с использованием многоуровневого фазового профиля.

Многоуровневый дифракционный элемент изготавливался методом прямой лазерной записи на фоторезисте с помощью круговой лазерной записывающей системы [6]. Схема, иллюстрирующая принцип формирования произвольной топологии в полярных координатах, показана на рис. 4, *a*. На одной подложке записывалось сразу несколько ФДМ для разных длин волн. После экспонирования фоторезиста путём кругового сканирования сфокусированного пучка с длиной волны 405 нм производилось жидкостное проявление фоторезиста для формирования заданного распределения глубины рельефа в нём (рис. 4, *b*). Локальная глубина рельефа определялась мощностью записанного пучка в данном месте поверхности, управляемой синхронизированно с вращением подложки и перемещением пучка вдоль радиальной координаты. После сушки фоторезиста рельеф с его поверхности переносился на кварцевую подложку с помощью реактивного ионного травления в плазме CF_4 . На рис. 4, *c* показан пример профилограммы рельефа изготовленного ФДМ. Поскольку достаточно сложно сопоставить его с определённым участком расчётного рельефа, прямой контроль формы практически невозможен. Более простой метод основан на измерении тестовых линейных решёток [7], записываемых одновременно и при таких же параметрах, как и основная структура, по периметру ФДМ. На рис. 4, *d* профилограмма демонстрирует высокое качество тестовой линейной решётки и её соответствие заданной глубине.

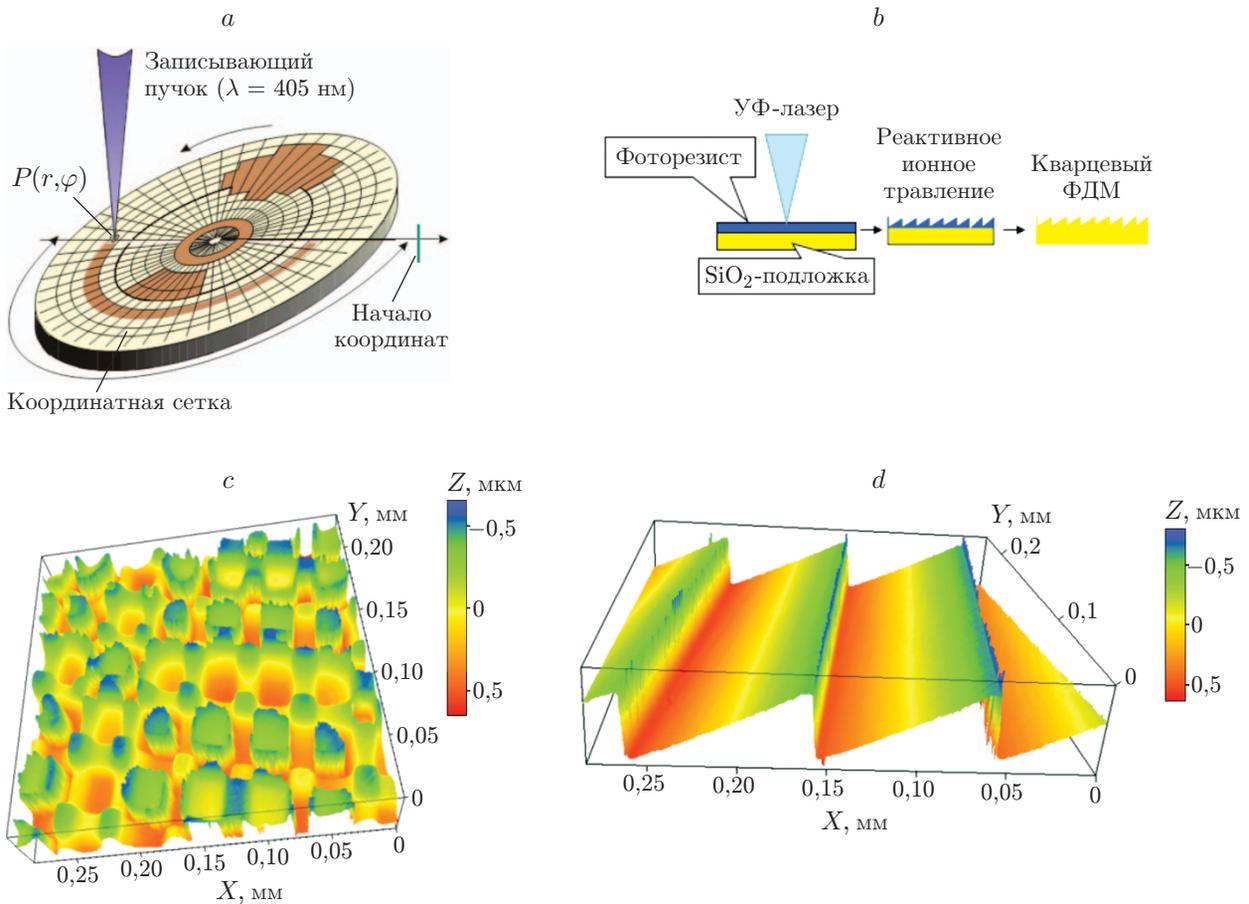


Рис. 4. Технологический процесс формирования ФДМ: *a* — схема формирования микроструктуры при круговом сканировании, *b* — технологические этапы, *c* — профилограмма рельефа ФДМ, *d* — профиль тестовой решётки

Тестирование дифракционного распределения ФДМ. Один из образцов ФДМ представляет собой фазовую структуру, нанесённую на кварцевую подложку в круге диаметром 8 мм. Он трансформирует падающий пучок с равномерным П-образным или гауссовым распределением интенсивности по сечению в матрицу размера 33×33 пучка, которые фокусируются на расстоянии $F = 210$ мм (рис. 5).

Характеристики ФДМ измерялись с использованием твердотельного одномодового лазера с длиной волны 532 нм. Из исходного пучка лазера с помощью десятикратного оптического расширителя формировался пучок диаметром 20 мм по уровню e^{-2} , затем пучок проходил через диафрагму диаметром 8 мм и падал на ФДМ. Таким образом, профиль интенсивности падающего пучка можно аппроксимировать П-образным профилем с диаметром 8 мм. Дифрагированный свет измерялся видеокамерой Lumenera Lw620, имеющей разрешение 3000×2208 ($10,5 \times 7,7$ мм) с линейным размером одного пикселя квадратной формы 3,5 мкм. Фотоматрица видеокамеры располагалась на расстоянии 210 мм от ФДМ. На ней фокусировались пучки.

На рис. 5 просматривается размытый ореол диаметром 8 мм, который обусловлен границей ФДМ с тестовой решёткой, нанесённой по всему его периметру.

Для исследования качества мультиплицированных пучков и распределения их интенсивностей измерялись профили распределения интенсивностей в зонах А, Б, В и Г (см. рис. 5). В силу центральной симметрии распределение интенсивностей пучков относитель-

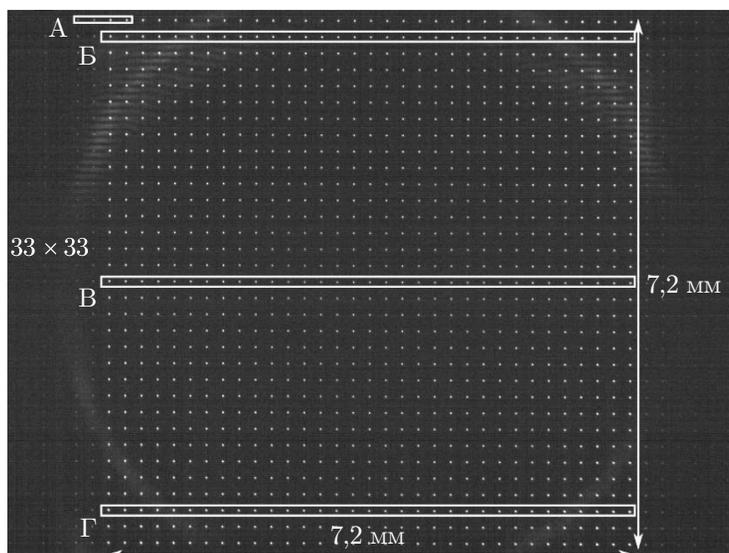


Рис. 5. Матрица размера 33×33 пучка в плоскости фокусировки

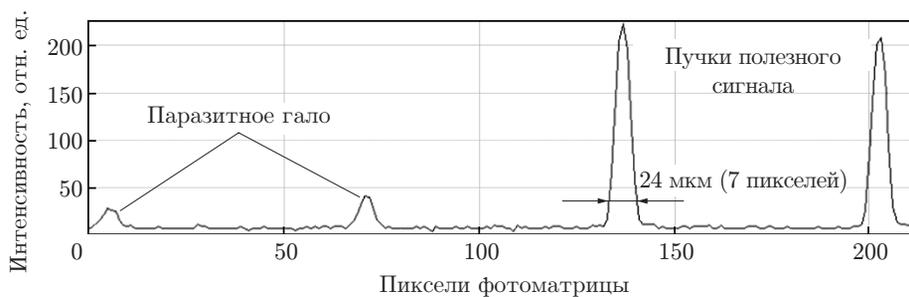


Рис. 6. Интенсивности пятен двух соседних пучков из матрицы пучков и паразитных пучков на фотоматрице из зоны А (размер 1 пикселя 3,5 мкм)

но центра матрицы пучков достаточно рассмотреть только горизонтальные участки Б, В и Г. Профили интенсивностей вычислялись по фотоснимку в области максимального значения интенсивности в ряду фокальных пятен. Измерения из области А показывают (рис. 6), что диаметр d каждого пучка по уровню интенсивности e^{-2} близок к дифракционному пределу, который может быть оценён из формулы для П-образного пучка:

$$d \approx \frac{1,21\lambda}{D/2F} \frac{1}{\sqrt{2}} = 23,9 \text{ мкм},$$

что соответствует примерно 7 пикселям фотоматрицы.

По интенсивности паразитных порядков можно оценить дифракционную эффективность данного ФДМ как более 90 % в полезном сигнале. Распределение интенсивности каждого сфокусированного пучка близко к гауссовому основной моды и определяет разрешающую способность конфокальной оптической системы, состоящей из элементов ФДМ, МД₁, ТЛ₁, О (см. рис. 1, б).

Размер сфокусированной матрицы пучков составляет $7,2 \times 7,2$ мм, т. е. расстояние между соседними пучками равно 0,225 мм. Распределение интенсивностей пучков внутри матрицы неравномерное: в центре оно около 40 % от максимального значения, которое находится в периферийных областях (рис. 7). Таким образом, равномерность распределения интенсивностей пучков пока далека от расчётной. По-видимому, это обусловлено ошибка-

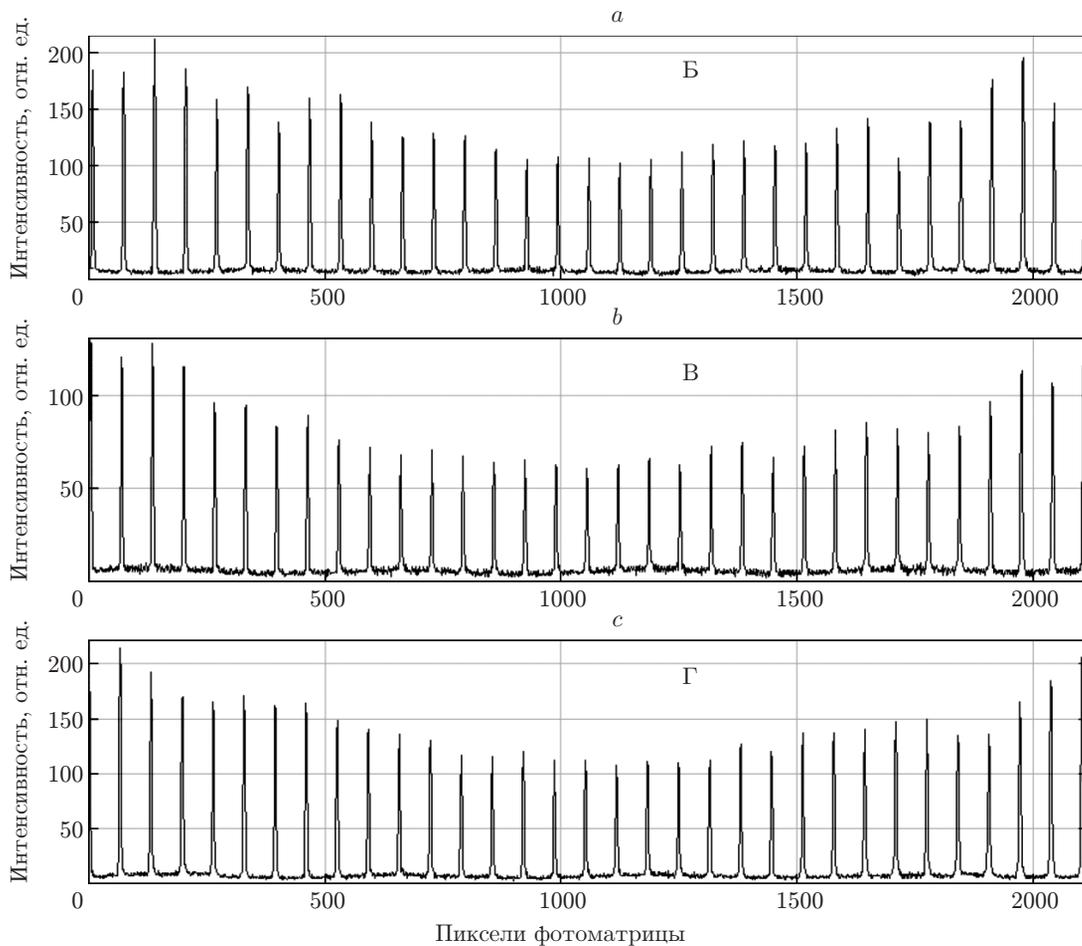


Рис. 7. Распределение профилей интенсивностей пучков из областей: *a* — Б, *b* — В, *c* — Г

ми при изготовлении ФДМ. Тем не менее матрицу пучков с таким уровнем неоднородности можно использовать для засветки чипа ДНК-секвенатора, поскольку интенсивность отклика будет иметь одинаковый порядок величины.

По рис. 5 была оценена дисторсия положения фокальных пятен. Для этого координаты центров всех пятен находились методом центра масс. Подбирались оптимальные положение и ориентация расчётной сетки с размерами $7,2 \times 7,2$ мм (расстояние между точками 0,225 мм). На рис. 8, *a* точками показана данная квадратная сетка, центр которой находится в координатах (0,0), крестиками — дисторсионные отклонения от соответствующих положений, увеличенные в 100 раз. Максимальное отклонение находится в правом верхнем углу и равно 0,52 мм (соответствует 5,2 мкм). Форма распределения отклонений связана с тем, что, возможно, поверхность видеоматрицы (либо ФДМ) находилась под небольшим углом к плоскости, перпендикулярной плоскости изображения матрицы пятен. Таким образом, дисторсия ФДМ достаточно мала: максимальное отклонение составляет величину $5,2 \text{ мкм} / 3600 \text{ мкм} \approx 0,15 \%$, что не хуже хорошего телецентрического объектива. На рис. 8, *a* заметно влияние паразитной засветки от тестовой решётки на положение фокальных пятен в виде кругового смещения диаметром 8 мм.

На рис. 8, *b* дана гистограмма распределения отклонений. Она важна с точки зрения оценки распределения в области фокусировки на чипе секвенатора. Основная часть пятен попадает в интервал до 3 мкм. При шестидесятикратном оптическом масштабировании отклонение центров сфокусированных пятен и нанотверстий без учёта абберации систе-

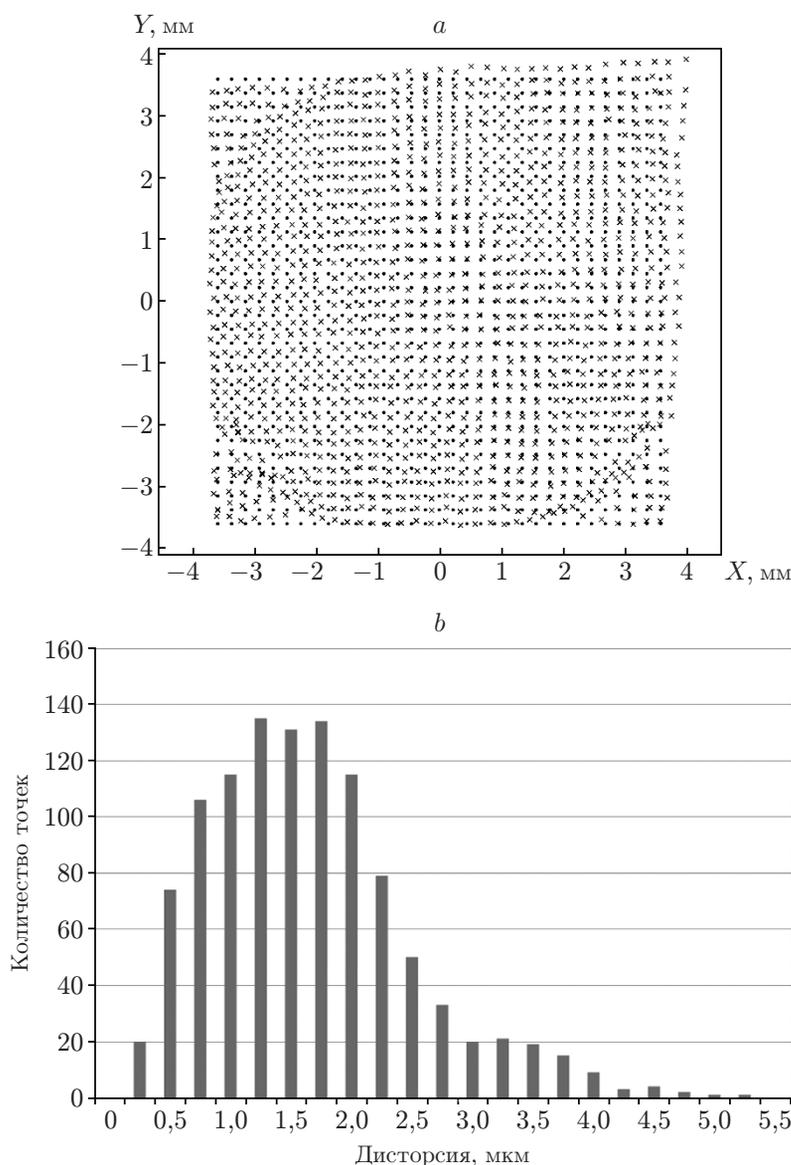


Рис. 8. Измерение искажений: *a* — дисторсионные искажения матрицы пучков в плоскости видеоматрицы (точки — квадратная сетка, крестики — отклонённое положение реальных точек, увеличенное в 100 раз), *b* — гистограмма распределения отклонений

мы линз ТЛ₁ — О (см. рис. 1) $3 \text{ мкм}/60 \approx 50 \text{ нм}$. Такое отклонение допустимо, если учесть, что по уровню интенсивности e^{-2} диаметр пятен сфокусированных пучков $\approx 500 \text{ нм}$.

Расстояние между пятнами дифракционного изображения можно прецизионно регулировать с помощью экспандера, если менять угол схождения/расхождения исходного пучка. Таким образом, возможно осуществлять прецизионный подбор расстояния между центрами крайних пучков в области фокусировки с точностью не хуже $\pm 5 \text{ мкм}$, что достаточно для решения задач фильтрации конфокальной матрицей диафрагм и совмещения пучков с матрицей нанореакторов.

Заключение. В данной работе приведены результаты расчёта, изготовления и характеристики фокусирующих дифракционных мультипликаторов, предназначенных для секвенатора ДНК. Оптимизационный расчёт выполнялся в приближении теории дифракции Френеля — Кирхгофа. Дифракционные элементы изготавливались методом прямой

лазерной записи на фоторезисте с помощью круговой лазерной записывающей системы. Представлены экспериментальные характеристики дифракционного элемента, создающего матрицу размера 33×33 пучка, которые фокусируются на расстоянии 210 мм в одной плоскости. Степень неоднородности интенсивностей пучков, определяемая соотношением интенсивностей из центральной области матрицы пучков к периферийным, составляет 40 %, что достаточно для применения в задачах ДНК-секвенирования. Определена величина максимальных дисторсионных искажений положений пятен на всём поле области фокусировки $<0,15$ %.

Разработка дифракционных мультипликаторов, формирующих матрицу лазерных пучков с заданным шагом и одновременно фокусирующих пучки в заданную плоскость, существенно упрощает схемотехнические решения при создании систем многоканального анализа в биологических исследованиях, что было продемонстрировано при создании прототипа ДНК-секвенатора в Сибирском отделении РАН [4]. Ещё одной областью применения ФДМ может быть интенсивно развивающаяся в последнее время многоканальная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, используемая для высокоскоростной профилометрии и флуоресцентной микроскопии [8, 9].

Экспериментальные исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования «Спектроскопия и оптика» в Институте автоматики и электрометрии СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Карпов Л. П., Блок А. С.** Мультипликация изображений и их пространственных частотных спектров // Матер. IV Всесоюз. шк. по голографии. Л.: ЛИЯФ, 1972. С. 137–156. URL: <http://bsfp.media-security.ru/school4/08.htm> (дата обращения: 18.07.2017).
2. **Ferstl M., Kratz C., Röder H., Hummelt C.** Simultaneous laser soldering by the use of multi-beam optics // Advanced Solid-State Lasers Congress. Technical Digest. OSA, 2013. JTh2A.17.
3. **Lundquist P. M., Zhong C. Z., Zhao P. et al.** Parallel confocal detection of single molecules in real time // Opt. Lett. 2008. **33**, N 9. P. 1026–1028
4. **Бессмельцев В. П., Терентьев В. С., Вилейко В. В. и др.** О создании платформы для исследования нуклеиновых кислот (ДНК-секвенатора) // Прикладная фотоника. 2016. **3**, № 4. С. 388–412.
5. **Борн М., Вольф Э.** Основы оптики. М.: Наука, 1973. 720 с.
6. **Poleshchuk A. G., Korolkov V. P., Nasyrov R. K.** Diffractive optical elements: fabrication and application // Proc. SPIE. 2014. **9283**. 928302.
7. **Корольков В. П., Остапенко С. В.** Характеризация профилограмм кусочно-непрерывного дифракционного микрорельефа // Оптический журнал. 2009. **76**, № 7. С. 34–41.
8. **Пат. № 2574863 РФ.** Многоканальный микроскоп (варианты) / В. П. Бессмельцев, В. С. Терентьев. Опубл. 10.02.16. Бюл. № 4.
9. **Бессмельцев В. П., Терентьев В. С.** Форма профиля флуоресценции от толстого слоя флуорофора в многоканальном конфокальном микроскопе // Оптический журнал. 2015. **82**, № 6. С. 58–65.

Поступила в редакцию 18 июля 2017 г.