

# СРАВНЕНИЕ РЕЖИМОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК НА ОСНОВЕ СЕЛЕНИДА КАДМИЯ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Ю. А. Кузищин<sup>1</sup> ✉, И. Л. Мартынов<sup>1</sup>, Е. В. Осипов<sup>1</sup>, П. С. Самохвалов<sup>2</sup>, А. А. Чистяков<sup>1</sup>, И. Р. Набиев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра физики микро- и наносистем, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва

<sup>2</sup> Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва

В настоящее время, флуоресцентная спектроскопия — это мощный инструмент, используемый в биологических и медицинских прикладных исследованиях. Одним из перспективных типов люминесцентных меток для одновременного обнаружения различных биологических агентов в одной пробе являются коллоидные полупроводниковые квантовые точки. Важным направлением совершенствования методики их применения является подбор оптимального режима возбуждения и регистрации флуоресцентного сигнала. Таким образом, целью настоящей работы было получение математического выражения для оценки отношения сигнал/шум в случае импульсного и модуляционного режимов возбуждения. Представлены результаты теоретического сравнения данных режимов возбуждения для регистрации флуоресцентного сигнала от ультра-малых количеств квантовых точек. Показано, что в случае применения квантовых точек CdSe/ZnS в условиях фоновой засветки с мощностью свыше 1 мкВт и временем накопления полезного сигнала свыше 100 мс для достижения высокой обнаружительной способности предпочтительнее использовать модуляционный режим возбуждения.

**Ключевые слова:** квантовые точки, CdSe/ZnS, люминесценция, возбуждение, фотодетекция

**Финансирование:** исследование поддержано Министерством здравоохранения Российской Федерации, в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)», государственный контракт К-27-НИР/146-2 от 28.12.15.

✉ **Для корреспонденции:** Юрий Александрович Кузищин  
Каширское ш., д. 31, г. Москва, 115409; yuriy.kuzishchin@gmail.com

**Статья получена:** 29.07.2018 **Статья принята к печати:** 25.08.2018

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2018.050

## COMPARISON OF FLUORESCENCE EXCITATION MODES FOR CDSE SEMI-CONDUCTOR QUANTUM DOTS USED IN MEDICAL RESEARCH

Kuzishchin YA<sup>1</sup> ✉, Martynov IL<sup>1</sup>, Osipov EV<sup>1</sup>, Samokhvalov PS<sup>2</sup>, Chistyakov AA<sup>1</sup>, Nabiev IR<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Physics of Micro- and Nanosystems, National Research Nuclear University MEPhI, Moscow

<sup>2</sup> Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI, Moscow

Fluorescence spectroscopy is a powerful tool used in applied biological and medical research. Colloid semi-conductor quantum dots are promising fluorescent tags for simultaneous detection of different biopathogens. The techniques employing these tags can be improved by selecting the optimal modes for signal excitation and detection. The aim of the present work was to derive a mathematical expression to describe the signal-to-noise ratios in the pulsed and modulated excitation modes. Below, we compare these two modes of fluorescence excitation in ultralow quantities of quantum dots. We demonstrate that modulated excitation should be preferred for CdSe/ZnS quantum dots given that signal accumulation time is over 100 mc and the photosensor is exposed to background light of  $> 1 \mu\text{W}$ .

**Keywords:** quantum dots, CdSe/ZnS, luminescence, excitation, photodetection

**Funding:** this work was supported by the Federal Target Program *The National System for Chemical and Biological Security of the Russian Federation (2015–2020)* and carried out under the state contract No. K-27-НИР/146-2 dated December 28, 2015.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yuri A. Kuzishchin  
Kashirskoe shosse, 31, Moscow, 115409; yuriy.kuzishchin@gmail.com

**Received:** 29.07.2018 **Accepted:** 25.08.2018

**DOI:** 10.24075/brsmu.2018.050

В настоящее время метод флуоресцентного анализа широко используется в биологических и медицинских прикладных исследованиях. С его помощью изучают структуру белков [1–3], диагностируют раковые [4–8] и аутоиммунные заболевания [9], детектируют и классифицируют биологические патогены и токсины [10]. В большинстве подходов для реализации флуоресцентного метода используют специальные флуоресцентные метки. В

настоящее время среди подобных меток наиболее перспективны полупроводниковые квантовые точки [8, 11–13]. По сравнению с традиционными органическими красителями квантовые точки обладают широким спектром поглощения [14, 15], высоким квантовым выходом [16] и рекордной фотостабильностью [17]. Кроме того, положение спектра испускания флуоресценции квантовых точек контролируется их размером, поэтому существует

возможность «настройки» спектра люминесценции квантовых точек за счет варьирования размера нанокристаллов [16, 18].

В ряде приложений, например при выявлении низких концентраций различных патогенов, поиске признаков аутоиммунных и онкологических заболеваний, необходимо регистрировать сверхнизкие по интенсивности люминесцентные сигналы [10]. Как известно, лучшие современные фотодетекторы, рассчитанные на работу в видимом спектральном диапазоне, способны регистрировать единичные фотоны [10]. Однако подобная техника требует глубокого охлаждения [19, 20] и крайне чувствительна к внешней фоновой засветке [20]. В совокупности с высокой стоимостью перечисленные факторы ограничивают область применения подобных фотодетекторов уникальными лабораторными установками и коммерческими приборами высокого уровня [21–25]. При этом в области прикладных исследований, связанных с проведением большого количества однотипных измерений, существует потребность в относительно высокочувствительном, компактном, недорогом и устойчивом к внешней фоновой засветке фотодетекторе для люминесцентного анализа.

Наиболее перспективным представляется построение подобного фотодетектора с использованием стандартного кремниевых ррп-фотодиода. Для подавления влияния воздействия фоновой засветки, могут быть использованы импульсный [26, 27] и модуляционный [28–30] методы возбуждения люминофора. В рамках первого подхода люминесцентный сигнал регистрируется в течение небольшого промежутка времени, сравнимого с временем жизни возбужденного состояния люминофора после возбуждающего импульса. При грамотном подборе интенсивности возбуждающего импульса пиковое значение амплитуды люминесцентного сигнала будет значительно превышать составляющую сигнала, связанную с фоновой засветкой. Недостатком такого метода является использование широкополосных фотодетекторов и регистрирующей аппаратуры, а также дорогостоящих источников возбуждающего лазерного излучения с длительностью импульса, в зависимости от конкретного флуорофора, в диапазоне от 10 нс до десятков пикосекунд.

При использовании второго подхода, влияние фоновой засветки нивелируется за счет превышения частоты модуляции возбуждающего излучения над характерной частотой флуктуации фонового излучения. Обычно частота модуляции излучения лежит в диапазоне 10–100 кГц [31, 32]. В результате при обработке сигнала появляется возможность выделить фурье-компоненту на частоте модуляции возбуждающего излучения и отсеять сигнал, связанный с низкочастотными колебаниями фона.

Практическая реализация фотодетектора для модуляционного режима возбуждения может быть основана на различных подходах, таких как применение узкополосного усилителя, синхронное детектирование, программный фурье-анализ люминесцентного сигнала или их комбинации [31, 32]. Каждый подход имеет свои особенности. Так, программный фурье-анализ люминесцентного сигнала при использовании усилителя с широкой полосой требует большого динамического диапазона и разрядности аналого-цифрового преобразователя (АЦП), но позволяет получить максимальное количество информации о регистрируемом сигнале. Подход с использованием узкополосного усилителя снижает требования к АЦП приемного устройства, но усложняет конструкцию усилителя.

В целом, модуляционный метод возбуждения люминофора требует более простого источника лазерного

излучения, чем импульсный. Метод не лишен недостатков, наиболее очевидным из которых является необходимость длительного накопления сигнала, в то время как метод импульсного возбуждения этого не требует.

Таким образом, на практике оптимальный выбор метода регистрации люминесцентного сигнала низкой интенсивности зависит как от фотофизических свойств используемого люминофора, так и от уровня фоновой засветки. При разработке устройств люминесцентного анализа необходимо также учитывать такие параметры, как быстродействие системы, уровень потребления электроэнергии и стоимость комплектующих.

Целью настоящей работы было проведение комплексного сравнительного анализа методов импульсного и модуляционного возбуждения для регистрации люминесценции низкой интенсивности в видимой области спектра с использованием фотодетекторов на базе кремниевых ррп-фотодиодов. В качестве исходного параметра фиксировалась средняя мощность источника возбуждающего излучения. Полученные данные позволят сделать оптимальный выбор системы люминесцентного анализа исходя из времени жизни возбужденного состояния люминофора и уровня фоновой засветки. Обсуждаются вопросы выбора оптимальной частоты модуляции возбуждающего излучения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для теоретического анализа различных режимов возбуждения флуорофоров в данном разделе будут получены выражения для отношения сигнал/шум на основе стандартной шумовой модели и приведены к удобному для их сравнения виду. В качестве условия сравнения зафиксирована средняя мощность возбуждающего излучения, что позволило сравнить импульсный и модуляционный режимы работы.

Известно, что выходным сигналом подавляющего числа фотодетекторов на основе Si ррп-фотодиодов является напряжение [33–36], в то время как сам фотодиод служит источником тока [37]. Для преобразования токового сигнала в напряжение в конструкцию фотодетектора входит трансимпедансный усилитель [38], параметры которого подбирают под конкретную задачу.

Основными характеристиками трансимпедансного усилителя являются сопротивление трансимпеданса  $R_T$  и верхняя частота полосы усиления  $f_p$ . Для сигнала с частотой ниже  $f_p$  справедливо выражение:

$$U_s = P_s \cdot S \cdot R_T,$$

где  $U_s$  — напряжение на выходе усилителя,  $P_s$  — мощность флуоресцентного сигнала,  $S$  — чувствительность фотодиода. Шум усилителя характеризуется плотностью шума выходного напряжения  $u_{na}$ . Однако на практике для характеристики шума фотодетектора из соображений удобства предпочитают использовать параметр NEP — эквивалентную шумовую мощность оптического сигнала [37]:

$$NEP = \frac{u_{na}}{R_T \cdot S} \left[ \frac{W}{\sqrt{Hz}} \right]. \quad (1)$$

Очевидно, что как NEP, так и порог обнаружения фотодетектора напрямую зависят от шумовых характеристик усилителя и режима работы фотодетектора.

Следует отметить, что шум многокаскадных усилителей определяется шумом их первого каскада [39], в то время как последующие каскады пропорционально увеличивают

амплитуду и сигнала, и шума, не меняя их взаимного отношения. Данное обстоятельство дает нам основание в качестве модели для анализа шумовых характеристик использовать однокаскадный усилитель. Как известно, основным источником шума в трансимпедансных усилителях является тепловой шум нагрузочного сопротивления  $R_f$ , который соответствует сопротивлению трансимпеданса  $R_T$ . Используя стандартное выражение для теплового шума [40] можно записать:

$$NEP = \frac{1}{S} \cdot \sqrt{\frac{4kT}{R_T}} \sim \frac{1}{\sqrt{R_T}}, \quad (2)$$

в котором  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура сопротивления.

Из выражения (2) следует, что увеличение нагрузочного сопротивления улучшает шумовые характеристики фотодетектора, однако вследствие наличия у фотодиода фоновой емкости  $C_p$  [37] одновременно приводит к снижению верхней рабочей частоты  $f_p$ . Приняв во внимание связь между  $R_T$  и  $C_p$ , выражение для NEP можно переписать в виде:

$$NEP = \frac{1}{S} \cdot \sqrt{8\pi kTC_p} \cdot f_p \quad (3)$$

Из выражения (3) следует, что наиболее простой подход для регистрации ультракороткого флуоресцентного сигнала заключается в использовании непрерывного возбуждения исследуемой пробы и фотодетектора с усилителем постоянного тока. Однако такой подход практически никогда не реализуется из-за наличия дополнительных источников шумового напряжения  $\Delta NEP(f)$  в области низких частот, включая фликкер-шум [29, 40, 41], попкорн-шум [40] и флуктуации мощности внешнего освещения [42–45]. На частотах ниже  $\sim 1$  кГц вклад от данных источников шума может значительно превышать плотность теплового шума и сводить на нет все преимущества низкочастотного фотодетектора [29, 46]. В результате на практике используют методы импульсного и модуляционного возбуждения, которые при грамотном выборе параметров фотодетектора позволяют в значительной степени исключить влияние дополнительных шумов [29]. Вместе с тем каждый из подходов имеет свои особенности.

В случае модуляционного возбуждения при использовании широкополосного усилителя в отсутствие фоновой засветки для отношения сигнал/шум можно записать следующее выражение:

$$S/N = \frac{P_{lum}}{P_n} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot 2}{\left( f_0^{f_m} \left( \frac{8\pi kTC_p f_p}{S^2} + \Delta NEP^2(f) \right) df \right)^{0.5}}, \quad (4)$$

где  $\langle P_{lum} \rangle$  — средняя мощность флуоресцентного сигнала,  $P_n$  — мощность шума,  $f_m$  — частота модуляции возбуждающего излучения. Предполагается, что скважность возбуждающих импульсов равна 2, а верхняя граничная частота усилителя  $f_p$  равняется частоте модуляции или незначительно превосходит ее.

Вместе с тем фотодетектор, работающий в режиме модуляционного возбуждения, может иметь лишь узкую полосу усиления  $\Delta f_p$  вблизи частоты модуляции  $f_p$ . Для реализации такого подхода можно использовать аппаратное или программное синхронное детектирование [32], узкополосный усилитель [47], узкополосный фильтр [47] или усреднение сигнала по множеству измерений [47]. В результате дополнительный вклад в шум фотодетектора  $\Delta NEP(f)$  может быть практически исключен. В случае

$f_m = n \cdot \Delta f_p$ , где  $n$  можно интерпретировать как число периодов, по которому происходит усреднение сигнала, для фотодетектора с узкополосным усилителем можно получить выражение:

$$S/N = \frac{P_{lum}}{P_n} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S \cdot \sqrt{n}}{f_m \sqrt{2\pi kTC_p}} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S}{\Delta f_p \sqrt{2\pi kTC_p} n}, \quad (5)$$

Отдельной важной задачей при таком подходе является выбор оптимальной частоты модуляции возбуждающего излучения. Из выражения (5) видно, что следует использовать как можно более низкую частоту, которая будет ограничена лишь требованиями по быстродействию системы. Однако в области частот ниже  $\sim 1$  кГц возрастает вклад дополнительных шумов и работа в таких режимах нецелесообразна. Наличие внешней засветки требует дополнительного анализа с учетом спектральной плотности флуктуации уровня освещения на разных частотах.

В импульсном режиме возбуждения реализуется идея высокой пиковой интенсивности полезного сигнала  $P_{lum} = \langle P_{lum} \rangle \cdot d$ , где  $d$  — скважность возбуждающих импульсов. Частота следования импульсов  $f_{ex}$  определяется из требований по быстродействию всей системы и ограничена сверху временем жизни возбужденного состояния флуорофора  $\tau_{lum}$ . Если при проведении измерений необходимо одновременно получить информацию о  $\tau_{lum}$ , то длительность возбуждающего импульса  $\tau_{ex}$  должна быть значительно меньше, чем  $\tau_{lum}$ . Однако в общем случае она может быть сравнима с  $\tau_{lum}$ , что снижает требования к верхней граничной частоте фотодетектора, которая в этом случае равна  $f_p \approx 1/\tau_{lum}$  или  $f_p = d \cdot f_{ex}$ .

Время жизни возбужденного состояния таких флуорофоров, как органические красители и квантовые точки, обычно лежит в диапазоне от 1 до 100 нс [48, 49]. Таким образом, верхняя граничная частота фотодетектора должна быть на уровне  $\sim 0,01$ – $1$  ГГц. В таких условиях вклад добавочного шума на низких частотах  $\Delta NEP(f)$  пренебрежимо мал по сравнению с полным тепловым шумом в широкой частотной полосе усилителя. В результате для NEP и отношения сигнал/шум фотодетектора, работающего в импульсном режиме возбуждения, можно написать выражения:

$$S/N = \frac{P_{lum}}{P_n} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S \cdot d}{\sqrt{8\pi kTC_p} f_p \cdot \sqrt{f_p}} = \frac{\langle P_{lum} \rangle \cdot S}{\sqrt{8\pi kTC_p} \cdot f_{ex}} \quad (6)$$

Для учета влияния на уровень шумов внешней засветки со средней мощностью  $P_{bg}$  полученные выражения должны быть изменены. Действительно для модуляционного режима возбуждения влияние фоновой засветки проявляется опосредованно в виде увеличения дробового шума. Для импульсного режима влияние внешней засветки проявляется напрямую как флуктуация уровня освещения с некоторой характерной граничной частотой  $f_{bg}$ . С учетом этого, выражения для отношения сигнал/шум для модуляционного и импульсного методов возбуждения флуорофора должны быть представлены следующим образом:

$$S/N = \frac{\langle P_{lum} \rangle}{\left[ 2\pi kTC_p \Delta f_p^2 n / S^2 + eP_{bg} \Delta f_p / 2S \right]^{0.5}}, \quad (7)$$

$$S/N = \frac{\langle P_{lum} \rangle}{\left[ 8\pi kTC_p f_{ex}^2 / S^2 + (P_{bg} \tau_{lum} f_{bg})^2 \right]^{0.5}} \cdot (8)$$

Выражения (7) и (8) дают возможность провести корректное сравнение величин отношения сигнал/шум

для модуляционного и импульсного методов возбуждения флуорофора при идентичных быстродействии и средней мощности сигнала флуоресценции, а значит и для одинаковой средней мощности возбуждающего излучения.

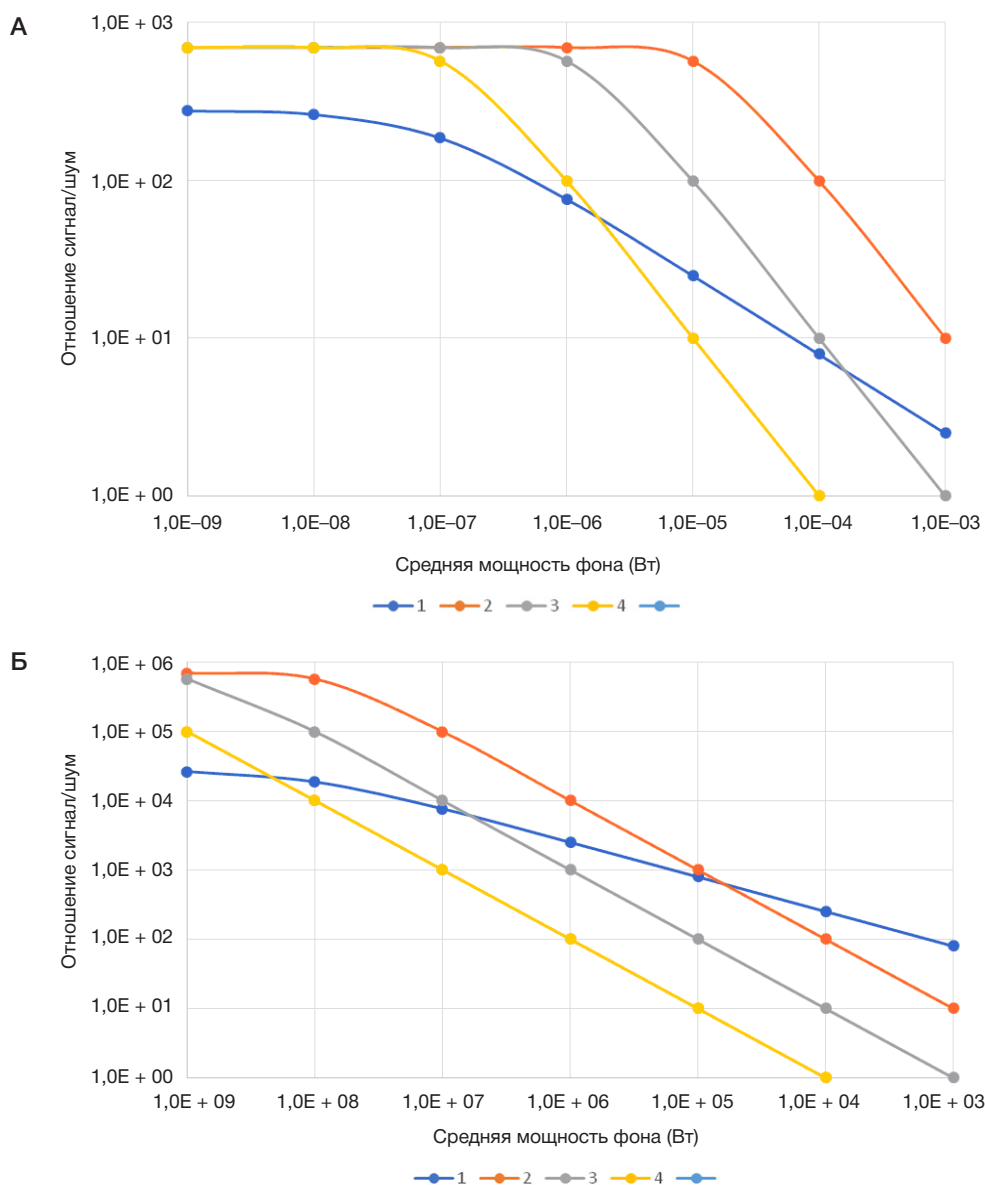
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основе выражений (7) и (8) было проанализировано отношение сигнал/шум в зависимости от различных параметров: мощности и частоты флуктуации внешней засветки фотодетектора, его быстродействия и времени жизни возбужденного состояния флуорофора. Для удобства анализа были построены следующие графики. На рис. 1А и 1Б представлены кривые зависимости отношения сигнал/шум от мощности внешней фоновой засветки для люминофоров с различным временем жизни возбужденного состояния. На рис. 2А и 2Б представлены графики зависимости отношения сигнал/шум от мощности внешней фоновой засветки для различных характерных частот флуктуации мощности внешней фоновой засветки.

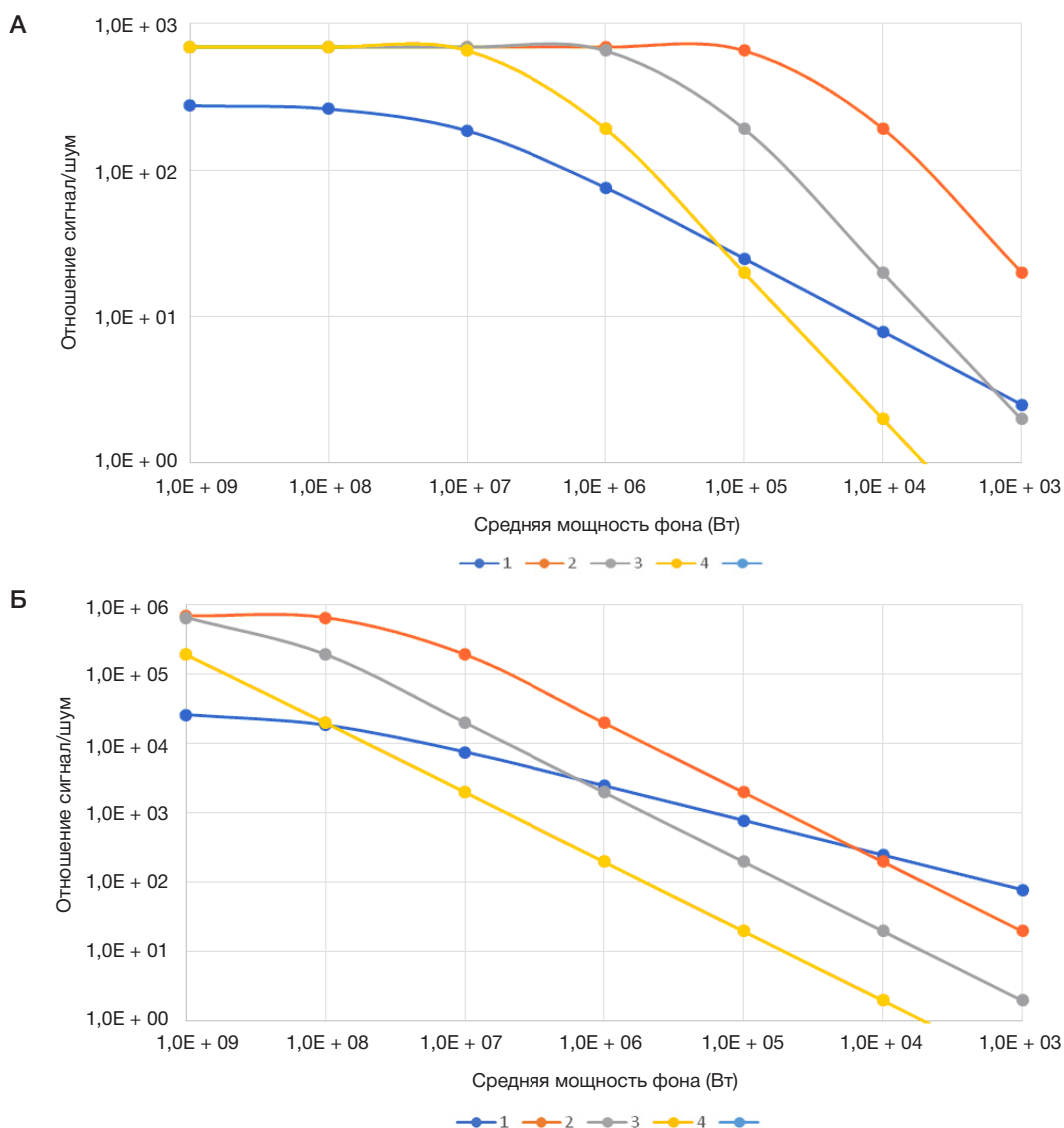
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отсутствии внешней фоновой засветки фотодетектора метод импульсного возбуждения предпочтителен (рис. 1А и 1Б). При наличии внешней засветки этот метод сохраняет свое преимущество в тех случаях, когда требуется высокое быстродействие системы регистрации флуоресцентного сигнала, а сам флуорофор обладает временем жизни возбужденного состояния не более 1 нс.

В то же время увеличение мощности внешней фоновой засветки уменьшает отношение сигнал/шум в случае импульсного метода быстрее, чем в случае модуляционного. Также необходимо учитывать, что отношение сигнал/шум зависит как от времени жизни возбужденного состояния флуорофора, так и от характерных частот флуктуации мощности фоновой засветки. Таким образом, величина отношения сигнал/шум в случае импульсного возбуждения меньше, чем отношение сигнал/шум в случае модуляции, если время жизни возбужденного состояния люминофора превышает 100 нс. Схожая ситуация наблюдается, если



**Рис. 1.** Отношение сигнал/шум фотоприемника в зависимости от мощности внешней фоновой засветки для режима модуляции (1) и импульсного режима возбуждения люминофора с временем жизни 1 нс (2), 10 нс (3) и 100 нс (4). (А) Время накопления сигнала 1 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, характерная частота флуктуаций фона 100 Гц. (Б) Время накопления сигнала 1000 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, характерная частота флуктуаций фона 100 Гц



**Рис. 2.** Отношение сигнал/шум фотоприемника в зависимости от мощности внешней фоновой засветки для режима модуляции (1) и импульсного режима возбуждения в случае, когда характерная частота флуктуации мощности фона равна 10 Гц (2), 100 Гц (3) и 1000 Гц (4). (А) Время накопления сигнала 1 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, время жизни возбужденного состояния люминофора 5 нс. (Б) Время накопления сигнала 1000 мс, средняя мощность люминесцентного сигнала 1 нВт, время жизни возбужденного состояния люминофора 5 нс

средняя мощность фона превышает  $\sim 1$  мкВт, а характерная частота ее флуктуации превышает 100 Гц. Такие условия возникают в случае применения сканирующих систем или при использовании искусственного освещения [42, 43, 50], особенно светодиодных ламп [46]. Предел обнаружения детектирующей системы при использовании модуляционного метода с правильно подобранной частотой модуляции не будет зависеть ни от времени жизни возбужденного состояния люминофора, ни от характерной частоты флуктуации мощности фоновой засветки (рис. 2А и 2Б).

Время жизни возбужденного состояния квантовых точек лежит, как правило, в диапазоне от 10 до 100 нс. Таким образом, использование модуляционного режима возбуждения для задач обнаружения сверхмалого количества полупроводниковых квантовых точек при наличии фоновой засветки со средней мощностью свыше 1 мкВт и временем накопления сигнала не менее 100 мс целесообразнее по сравнению с

импульсным режимом. Более того, источники возбуждения для модуляционного режима доступнее по стоимости и проще по сравнению с импульсными источниками с нано- и пикосекундными значениями длительности импульсов.

## ВЫВОДЫ

Получено выражение для вычисления величины отношения сигнал/шум для фотоприемников на основе кремниевых ррн-фотодиодов, работающих с системами как импульсного, так и модуляционного возбуждения люминесцентных меток видимого диапазона в условиях наличия фоновой засветки. Продемонстрировано, что модуляционный режим возбуждения целесообразнее импульсного применительно к люминесцентным меткам на основе полупроводниковых точек CdSe/ZnS в присутствии фоновой засветки со средней мощностью свыше 1 мкВт и временем накопления сигнала не короче 100 мс.



## Литература

- Moullick R, Udgaonkar JB. Identification and structural characterization of the precursor conformation of the prion protein which directly initiates misfolding and oligomerization. *J Mol Biol.* 2017; 429 (6): 886–899.
- Chen H, Rhoades E. Fluorescence characterization of denatured proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18 (4): 516–524.
- Hevekerl H, Tornmalm J, Widengren J. Fluorescence-based characterization of non-fluorescent transient states of tryptophan — prospects for protein conformation and interaction studies. *Sci Rep.* 2016; 6 (1): 35052.
- Dramićanin T, Dramićanin M. Using fluorescence spectroscopy to diagnose breast cancer. *Appl Mol Spectrosc to Curr Res Chem Biol Sci.* 2016.
- Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisserli A, et al. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasensitive diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine: NBM.* 2012; 8 (4): 516–25.
- Bilan R, Ametzazurra A, Brazhnik K, et al. Quantum-dot-based suspension microarray for multiplex detection of lung cancer markers: preclinical validation and comparison with the Luminex xMAP® system. *Sci Rep.* 2017; (7): 44668.
- Brazhnik K, Sokolova Z, Baryshnikova M, et al. Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multiplexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples. *Nanomedicine: NBM.* 2015; 11 (5): 1065–75.
- Hafian H, Sukhanova A, Turini M, et al. Multiphoton imaging of tumor biomarkers with conjugates of single-domain antibodies and quantum dots. *Nanomedicine: NBM.* 2014; 10 (8): 1701–9.
- Sukhanova A, Susha AS, Bek A, et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: Antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases. *Nano Lett.* 2007; 7 (8): 2322–7.
- Wessels L, Raad H. Recent advances in point of care diagnostic tools: a review. *Am J Eng Appl Sci.* 2016; 9 (4): 1088–1095.
- Samokhvalov P, Artemyev M, Nabiev I. Basic principles and current trends in colloidal synthesis of highly luminescent semiconductor nanocrystals. *Chem – A Eur J.* 2013; 19 (5): 1534–1546.
- Vokhmintsev KV, Samokhvalov PS, Nabiev I. Charge transfer and separation in photoexcited quantum dot-based systems. *Nano Today.* 2016; 11 (2): 189–211.
- Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods.* 2008; 5 (9): 763–775.
- Yu WW, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem Mater.* 2003; 15 (14): 2854–60.
- Jasieniak J, Smith L, Van Embden J, Mulvaney P, Califano M. Re-examination of the size-dependent absorption properties of CdSe quantum dots. *J Phys Chem C.* 2009; 113 (45): 19468–74.
- Krivenkov V, Samokhvalov P, Zvaigzne M, et al. Ligand-mediated photobrightening and photodarkening of CdSe/ZnS quantum dot ensembles. *J Phys Chem C.* 2018; DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b04544.
- Ramos-Gomes F, Bode J, Sukhanova A et al. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Sci Rep.* 2018; (8): 4595.
- Bonilla JC, Bozkurt F, Ansari S, Sozer N, Kokini JL. Applications of quantum dots in food Science and biology. *Trends Food Sci Technol.* 2016; (53): 75–89.
- Collazuol G, Bisogni MG, Marcatili S, Piemonte C, Del Guerra A. Studies of silicon photomultipliers at cryogenic temperatures. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 2011; 628 (1): 389–92.
- Takeuchi S, Kim J, Yamamoto Y, Hogue HH. Development of a high-quantum-efficiency single-photon counting system. *Appl Phys Lett.* 1999; 74 (8): 1063–5.
- Moon S, Kim DY. Analog single-photon counter for high-speed scanning microscopy. *Opt Express.* 2008; 16 (18): 13990–14003.
- Benninger RKP, Ashby WJ, Ring E a., Piston DW. A single-photon counting detector for increased sensitivity in two-photon laser scanning microscopy. *Opt Lett.* 2008; 33 (24): 2895–7.
- Du B, Pang C, Wu D, et al. High-speed photon-counting laser ranging for broad range of distances. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 1–6.
- Jang JY, Cho M. Image visualization of photon counting confocal microscopy using statistical estimation. *Optik (Stuttg).* 2016; 127 (2): 844–7.
- Chen W, Wang X, Wang B, et al. Lock-in-photon-counting-based highly-sensitive and large-dynamic imaging system for continuous-wave diffuse optical tomography. *Biomed Opt Express.* 2016; 7 (2): 499.
- Boscher ND, Choquet P, Duday D, Verdier S. Advantages of a pulsed electrical excitation mode on the corrosion performance of organosilicon thin films deposited on aluminium foil by atmospheric pressure dielectric barrier discharge. *Plasma Process Polym.* 2010; 7 (2): 163–71.
- Steen HB, Sørensen OI. Pulse Modulation of the excitation light source boosts the sensitivity of an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry.* 1993; (14): 115–22.
- Huang C, Lu X, Jiang Y, Wang X, Qiao Z, Fan W. Real-time characterization of FM-AM modulation in a high-power laser facility using an RF-photonics system and a denoising algorithm. *Appl Opt.* 2017; 56 (6): 1610–15.
- Gak J, Miguez M, Bremermann M, Arnaud A. On the reduction of thermal and flicker noise in ENG signal recording amplifiers. *Analog Integr Circuits Signal Process.* 2008; 57 (1–2): 39–48.
- De Marcellis A, Palange E, Giuliani R, Janneh M. Very high sensitivity electrically modulated Si-photodiode in photovoltaic-mode as phase-sensitive detector of light power. *Proc IEEE Sensors.* 2014; 2014 December: 1115–7.
- Ayat M, Karami MA, Mirzakuchaki S, Beheshti-Shirazi A. Design of multiple modulated frequency lock-in amplifier for tapping-mode atomic force microscopy systems. *IEEE Trans Instrum Meas.* 2016; 65 (10): 2284–92.
- Bhattacharyya S, Ahmed RN, Purkayastha BB, Bhattacharyya K. Implementation of digital lock-in amplifier. *J Phys Conf Ser.* 2016; 759 (1).
- Datta S, Rajagopalan S, Lemke S, Joshi A. Balanced PIN-TIA photoreceiver with integrated 3 dB fiber coupler for distributed fiber optic sensors. 2014; 9098: 90980Y.
- Angelini P, Blache F, Caillaud C, et al. High sensitivity SOA-PIN/TIA photoreceiver for 40 Gb/s applications and beyond. *Int J Microw Wirel Technol.* 2016; 8 (03): 437–445.
- Rahman SN, Hall D, Mei Z, Lo Y-H. Integrated 1550 nm photoreceiver with built-in amplification and feedback mechanisms. *Opt Lett.* 2013; 38 (20): 4166–9.
- Cervantes FG, Livas J, Silverberg R, Buchanan E, Stebbins R. Characterization of photoreceivers for LISA. *Class Quantum Gravity.* 2011; 28 (9).
- M A, Gregory H. Photodetection. In: Michael Bass, editor. *Handbook of Optics.* McGraw-Hill, Inc.; 1994. 1664 p.
- Lin TY, Green RJ, O'Connor PB. A low noise single-transistor transimpedance preamplifier for Fourier-transform mass spectrometry using a T feedback network. *Rev Sci Instrum.* 2012;83(9).
- Jaquay JW. Designers Guide to: Instrumentation amplifiers. *Exp Tech.* 1977;2(2):40–43.
- Wai Chen. *The Electrical Engineering Handbook.* Elsevier Academic Press; 2004. 1228 p.
- Vernotte F, Lantz E. Metrology and 1/f noise: Linear regressions and confidence intervals in flicker noise context. *Metrologia.* 2015; 52 (2): 222–37.
- Sindhubala K, Vijayalakshmi B. Review in impact of ambient light noise sources and applications in optical wireless communication using LED. *International Journal of Applied Engineering Research.* 2015; 10 (12): 31115–30.
- Pham Q, Rachim V, An J, Chung W-Y. Ambient light rejection using a novel average voltage tracking in visible light communication system. *Appl Sci.* 2017; 7 (7): 670.
- Shen Z, Thomas JJ, Siuzdak G, Blackledge RD. A case study on forensic polymer analysis by DIOS-MS: the suspect who gave us the SLIP. *J Forensic Sci.* 2004; 49 (5): 1028–35.

45. Cletus B, Olds W, Fredericks PM, Jaatinen E, Izake EL. Real-time detection of concealed chemical hazards under ambient light conditions using raman spectroscopy. *J Forensic Sci.* 2013; 58 (4): 1008–14.
46. Kim T, Rylander M, Powers EJ, Grady WM, Arapostathis A. LED lamp flicker caused by interharmonics. *Conf Rec - IEEE Instrum Meas Technol Conf.* 2008: 1920–5.
47. Zumbahlen H, editor. *Linear Circuit Design Handbook.* Newnes/Elsevier; 2008. 960 p
48. Gong K, Martin JE, Shea-Rohwer LE, Lu P, Kelley DF. Radiative lifetimes of zincblende CdSe/CdS quantum dots. *J Phys Chem C.* 2015; 119 (4): 2231–8.
49. Berezin MMY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev.* 2011; 110 (5): 2641–84.
50. Kovalenko B, Roskosky M, Freedman BA, Shuler MS. Effect of ambient light on near infrared spectroscopy. *Trauma Treat.* 2015; 911–6.

## References

1. Moulick R, Udgaonkar JB. Identification and structural characterization of the precursor conformation of the prion protein which directly initiates misfolding and oligomerization. *J Mol Biol.* 2017; 429 (6): 886–899.
2. Chen H, Rhoades E. Fluorescence characterization of denatured proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2008; 18 (4): 516–524.
3. Hevekerl H, Tornmalm J, Widengren J. Fluorescence-based characterization of non-fluorescent transient states of tryptophan — prospects for protein conformation and interaction studies. *Sci Rep.* 2016; 6 (1): 35052.
4. Dramićanin T, Dramićanin M. Using fluorescence spectroscopy to diagnose breast cancer. *Appl Mol Spectrosc to Curr Res Chem Biol Sci.* 2016.
5. Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisserli A, et al. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine: NBM.* 2012; 8 (4): 516–25.
6. Bilan R, Ametzazurra A, Brazhnik K, et al. Quantum-dot-based suspension microarray for multiplex detection of lung cancer markers: preclinical validation and comparison with the Luminex xMAP® system. *Sci Rep.* 2017; (7): 44668.
7. Brazhnik K, Sokolova Z, Baryshnikova M, et al. Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multiplexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples. *Nanomedicine: NBM.* 2015; 11 (5): 1065–75.
8. Hafian H, Sukhanova A, Turini M, et al. Multiphoton imaging of tumor biomarkers with conjugates of single-domain antibodies and quantum dots. *Nanomedicine: NBM.* 2014; 10 (8): 1701–9.
9. Sukhanova A, Susha AS, Bek A, et al. Nanocrystal-encoded fluorescent microbeads for proteomics: Antibody profiling and diagnostics of autoimmune diseases. *Nano Lett.* 2007; 7 (8): 2322–7.
10. Wessels L, Raad H. Recent advances in point of care diagnostic tools: a review. *Am J Eng Appl Sci.* 2016; 9 (4): 1088–1095.
11. Samokhvalov P, Artemyev M, Nabiev I. Basic principles and current trends in colloidal synthesis of highly luminescent semiconductor nanocrystals. *Chem – A Eur J.* 2013; 19 (5): 1534–1546.
12. Volkhmintcev KV, Samokhvalov PS, Nabiev I. Charge transfer and separation in photoexcited quantum dot-based systems. *Nano Today.* 2016; 11 (2): 189–211.
13. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods.* 2008; 5 (9): 763–775.
14. Yu WW, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem Mater.* 2003; 15 (14): 2854–60.
15. Jasieniak J, Smith L, Van Embden J, Mulvaney P, Califano M. Re-examination of the size-dependent absorption properties of CdSe quantum dots. *J Phys Chem C.* 2009; 113 (45): 19468–74.
16. Krivenkov V, Samokhvalov P, Zvaigzne M, et al. Ligand-mediated photobrightening and photodarkening of CdSe/ZnS quantum dot ensembles. *J Phys Chem C.* 2018; DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b04544.
17. Ramos-Gomes F, Bode J, Sukhanova A et al. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Sci Rep.* 2018; (8): 4595.
18. Bonilla JC, Bozkurt F, Ansari S, Sozer N, Kokini JL. Applications of quantum dots in food Science and biology. *Trends Food Sci Technol.* 2016; (53): 75–89.
19. Collazuelo G, Bisogni MG, Marcatili S, Piemonte C, Del Guerra A. Studies of silicon photomultipliers at cryogenic temperatures. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 2011; 628 (1): 389–92.
20. Takeuchi S, Kim J, Yamamoto Y, Hogue HH. Development of a high-quantum-efficiency single-photon counting system. *Appl Phys Lett.* 1999; 74 (8): 1063–5.
21. Moon S, Kim DY. Analog single-photon counter for high-speed scanning microscopy. *Opt Express.* 2008; 16 (18): 13990–14003.
22. Benninger RKP, Ashby WJ, Ring E a., Piston DW. A single-photon counting detector for increased sensitivity in two-photon laser scanning microscopy. *Opt Lett.* 2008; 33 (24): 2895–7.
23. Du B, Pang C, Wu D, et al. High-speed photon-counting laser ranging for broad range of distances. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 1–6.
24. Jang JY, Cho M. Image visualization of photon counting confocal microscopy using statistical estimation. *Optik (Stuttg).* 2016; 127 (2): 844–7.
25. Chen W, Wang X, Wang B, et al. Lock-in-photon-counting-based highly-sensitive and large-dynamic imaging system for continuous-wave diffuse optical tomography. *Biomed Opt Express.* 2016; 7 (2): 499.
26. Boscher ND, Choquet P, Duda D, Verdier S. Advantages of a pulsed electrical excitation mode on the corrosion performance of organosilicon thin films deposited on aluminium foil by atmospheric pressure dielectric barrier discharge. *Plasma Process Polym.* 2010; 7 (2): 163–71.
27. Steen HB, Sørensen OI. Pulse Modulation of the excitation light source boosts the sensitivity of an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry.* 1993; (14): 115–22.
28. Huang C, Lu X, Jiang Y, Wang X, Qiao Z, Fan W. Real-time characterization of FM-AM modulation in a high-power laser facility using an RF-photonics system and a denoising algorithm. *Appl Opt.* 2017; 56 (6): 1610–15.
29. Gak J, Miguez M, Bremermann M, Arnaud A. On the reduction of thermal and flicker noise in ENG signal recording amplifiers. *Analog Integr Circuits Signal Process.* 2008; 57 (1–2): 39–48.
30. De Marcellis A, Palange E, Giuliani R, Jannah M. Very high sensitivity electrically modulated Si-photodiode in photovoltaic-mode as phase-sensitive detector of light power. *Proc IEEE Sensors.* 2014; 2014 December: 1115–7.
31. Ayat M, Karami MA, Mirzakuchaki S, Beheshti-Shirazi A. Design of multiple modulated frequency lock-in amplifier for tapping-mode atomic force microscopy systems. *IEEE Trans Instrum Meas.* 2016; 65 (10): 2284–92.
32. Bhattacharyya S, Ahmed RN, Purkayastha BB, Bhattacharyya K. Implementation of digital lock-in amplifier. *J Phys Conf Ser.* 2016; 759 (1).
33. Datta S, Rajagopalan S, Lemke S, Joshi A. Balanced PIN-TIA photoreceiver with integrated 3 dB fiber coupler for distributed fiber optic sensors. 2014; 9098: 90980Y.
34. Angelini P, Blache F, Caillaud C, et al. High sensitivity SOA-PIN/TIA photoreceiver for 40 Gb/s applications and beyond. *Int J Microw Wirel Technol.* 2016; 8 (03): 437–445.
35. Rahman SN, Hall D, Mei Z, Lo Y-H. Integrated 1550 nm photoreceiver with built-in amplification and feedback mechanisms. *Opt Lett.* 2013; 38 (20): 4166–9.

36. Cervantes FG, Livas J, Silverberg R, Buchanan E, Stebbins R. Characterization of photoreceivers for LISA. *Class Quantum Gravity*. 2011; 28 (9).
37. M A, Gregory H. Photodetection. In: Michael Bass, editor. *Handbook of Optics*. McGraw-Hill, Inc.; 1994. 1664 p.
38. Lin TY, Green RJ, O'Connor PB. A low noise single-transistor transimpedance preamplifier for Fourier-transform mass spectrometry using a T feedback network. *Rev Sci Instrum*. 2012;83(9).
39. Jaquay JW. Designers Guide to: Instrumentation amplifiers. *Exp Tech*. 1977;2(2):40–43.
40. Wai Chen. *The Electrical Engineering Handbook*. Elsevier Academic Press; 2004. 1228 p.
41. Vernotte F, Lantz E. Metrology and 1/f noise: Linear regressions and confidence intervals in flicker noise context. *Metrologia*. 2015; 52 (2): 222–37.
42. Sindhubala K, Vijayalakshmi B. Review in impact of ambient light noise sources and applications in optical wireless communication using LED. *International Journal of Applied Engineering Research*. 2015; 10 (12): 31115–30.
43. Pham Q, Rachim V, An J, Chung W-Y. Ambient light rejection using a novel average voltage tracking in visible light communication system. *Appl Sci*. 2017; 7 (7): 670.
44. Shen Z, Thomas JJ, Siuzdak G, Blackledge RD. A case study on forensic polymer analysis by DIOS-MS: the suspect who gave us the SLIP. *J Forensic Sci*. 2004; 49 (5): 1028–35.
45. Cletus B, Olds W, Fredericks PM, Jaatinen E, Izake EL. Real-time detection of concealed chemical hazards under ambient light conditions using raman spectroscopy. *J Forensic Sci*. 2013; 58 (4): 1008–14.
46. Kim T, Rylander M, Powers EJ, Grady WM, Arapostathis A. LED lamp flicker caused by interharmonics. *Conf Rec - IEEE Instrum Meas Technol Conf*. 2008: 1920–5.
47. Zumbahlen H, editor. *Linear Circuit Design Handbook*. Newnes/Elsevier; 2008. 960 p
48. Gong K, Martin JE, Shea-Rohwer LE, Lu P, Kelley DF. Radiative lifetimes of zincblende CdSe/CdS quantum dots. *J Phys Chem C*. 2015; 119 (4): 2231–8.
49. Berezin MMY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev*. 2011; 110 (5): 2641–84.
50. Kovalenko B, Roskosky M, Freedman BA, Shuler MS. Effect of ambient light on near infrared spectroscopy. *Trauma Treat*. 2015; 911–6.