

УДК 535.37

СПЕКТРОФЛУОРИМЕТР ДЛЯ СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

М.П. САМЦОВ¹, Д.С. ТАРАСОВ^{1,2}, А.Е. РАДЬКО¹, К.А. ШЕВЧЕНКО¹, А.А. КИРСАНОВ²,
Н.В. ЛАБОДА^{1,2}, Е.С. ВОРОПАЙ²

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» БГУ (Минск, Беларусь)

²Белорусский государственный университет, (Минск, Беларусь)

Аннотация. Разработан и изготовлен лазерный спектрофлуориметр для спектрально-кинетического люминесцентного анализа, который позволяет регистрировать стационарный спектр флуоресценции, кинетику затухания флуоресценции по методу время-коррелированного счета одиночных фотонов при возбуждении импульсным лазерным источником света. Разработано программное обеспечение для анализа кинетики затухания флуоресценции. Выполнен подбор эталонных образцов для контроля работы аппаратуры для измерения длительности затухания флуоресценции. Для наносекундного временного диапазона предложено использовать набор растворов органических красителей в органических растворителях. В него вошли растворы в этаноле красителей оксазин 17, DCM, родамин 6Ж и индотрикарбодиазинового красителя НТС, а также раствор нового индотрикарбодиазинового красителя в о-дихлорбензоле. Показано, что в таких средах растворы представляют собой систему из одного поглощающего и флуоресцирующего центра, высокая стабильность при хранении красителей в виде порошка и достаточная для проведения измерений в соответствующих растворах. Для микросекундного диапазона предложено использовать сапфир с титаном.

Ключевые слова: спектрофлуориметр, спектрально-кинетический люминесцентный анализ, длительность затухания флуоресценции, время-коррелированный счет одиночных фотонов, органические красители.

SPECTROFLUOROMETER FOR SPECTRAL-KINETIC ANALYSIS OF BIOLOGICAL OBJECTS

M.P. SAMTSOV¹, D.S. TARASAU^{1,2}, A.E. RADZKO¹, K.A. SHEVCHENKO¹, A.A. KIRSANOV²,
N.V. LABODA¹, E.S. VOROPAY²

¹A.N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University (Minsk, Belarus)

²Belarusian State University (Minsk, Belarus)

Abstract. The laser spectrofluorometer for spectral-kinetic luminescence analysis has been developed and manufactured, which allows recording a stationary fluorescence spectrum, fluorescence decay kinetics using the time-correlated single photon counting method when excited by a selected pulsed light source. Software for analyzing fluorescence decay kinetics has been developed. A selection of reference samples for monitoring the operation of equipment for measuring the fluorescence decay time has been carried out. For the nanosecond time range, it is proposed to use a set of solutions of organic dyes in organic solvents. It includes solutions of oxazine 17, DCM, rhodamine 6G and indotricarbocyanine dye НТС in ethanol, as well as a solution of a new indotricarbocyanine dye in o-dichlorobenzene. It is shown that in such media, the solutions represent a system of one absorbing and fluorescent center, which is necessary for using them as a standard. High stability during storage of the dyes in powder form and sufficient for measurements in the corresponding solutions are established. For the microsecond range, it is proposed to use sapphire with titanium.

Keywords: spectrofluorometer, spectral-kinetic luminescence analysis, fluorescence decay time, time-correlated single photon counting, organic dyes.

Введение

Науки о жизни (от англ. life sciences) сегодня являются одними из приоритетных направлений развития науки и технологий во всем мире. Успехи здесь определяются главным образом доступом к современному аналитическому оборудованию, которое позволяет получать

большой объем информации о строении и функционировании различных биобъектов. В этом отношении хорошо себя зарекомендовал люминесцентный анализ как один из наиболее информативных спектральных методов исследования объектов в различных областях науки. В последние два десятилетия его применение значительно расширилось ввиду развития аппаратуры для измерения временных характеристик свечения люминесценции. Прежде всего это обусловлено появлением мегагерцовых импульсных лазерных источников с субнаносекундной и пикосекундной длительностью, а также развитием микроэлектронной базы и ростом вычислительных возможностей.

Использование спектрально-кинетического люминесцентного анализа в оптико-физических, биологических и других исследованиях позволяет получать существенно более обширную информацию об изучаемых системах по сравнению с чисто спектральными измерениями. Актуальность использования аппаратуры для временного анализа спектрально-люминесцентных параметров обусловлена тем, что для детального анализа многих процессов, основанного на регистрации спектров поглощения и испускания флуоресцентных зондов, которые в большинстве случаев являются широкополосными и бесструктурными, таких характеристик недостаточно. При совпадении спектров люминесценции более информативным в этом случае оказываются кинетические параметры испускания. На базе измерений спектрально-кинетических параметров обеспечивается изучение молекулярной структуры белков и мембран, механизмов переноса ионов в мембранах, механизмов аллергических реакций и многие другие. Высокая чувствительность люминесцентного анализа позволяет определять с его помощью малые концентрации биологически важных веществ, определять патологические изменения биотканей и биоорганизмов.

Несмотря на актуальность исследований с высоким временным разрешением, аппаратура подобного рода в Республике Беларусь серийно не выпускается. В данной работе описан разработанный и созданный лазерный спектрофлуориметр для спектрально-кинетического люминесцентного анализа в экспериментальной физике и биологии.

Результаты и их обсуждение

Разработанный лазерный спектрофлуориметр позволяет регистрировать стационарный спектр флуоресценции и кинетику затухания флуоресценции по методу время-коррелированного счета одиночных фотонов (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) образцов при возбуждении выбранным импульсным источником света. Комплекс ориентирован на решение широкого круга задач спектрально-кинетического люминесцентного анализа. Соответствуя по своим характеристикам аналогичным изделиям зарубежных фирм (Horiba, Япония; Edinburg Instruments Ltd., Великобритания; PicoQuant, Германия), он имеет значительно меньшую стоимость.

При построении прибора в основу положен модульный принцип. Это позволяет легко реализовать такую конфигурацию спектрофлуориметра, которая требуется для конкретных физико-технических приложений. С другой стороны, посредством совершенствования отдельных ключевых узлов можно улучшать параметры аппаратуры в целом. Помимо этого, существуют возможности замены в составе комплекса узлов со схожим функциональным назначением, но существенно иными параметрами.

Принципиальная схема спектрофлуориметра состоит из трёх функционально законченных частей: оптико-механического блока, электронного блока и персональной электронно-вычислительной машины для выполнения специального программного обеспечения для управления спектрофлуориметром и анализа кинетики затухания флуоресценции. В составе спектрофлуориметра имеются сменные импульсные источники возбуждения (лазерные и светодиодные), камера образцов, монохроматор M150 (Solar LS, Беларусь), одноквантовое фотоприемное устройство и многоканальное фотоприемное устройство. В спектрометр включен набор из нескольких лазерных и светодиодных источников света собственной разработки, которые покрывают спектральный диапазон 250-760 нм (рисунок). Последнее позволило обойтись без монохроматора возбуждения, что упростило и удешевило комплекс без ущерба для параметров. Импульсный режим источников света реализован посредством оригинального схемотехнического решения. Созданные импульсные

источники могут работать в пико- и нано- режимах, с характерными длительностями импульса 0,2-0,5 и 1,5-3,0 нс. Реализована возможность регулировки частоты следования импульсов от килогерца до нескольких мегагерц, что необходимо для обеспечения возможности исследования люминесценции в микросекундном или наносекундном диапазонах.

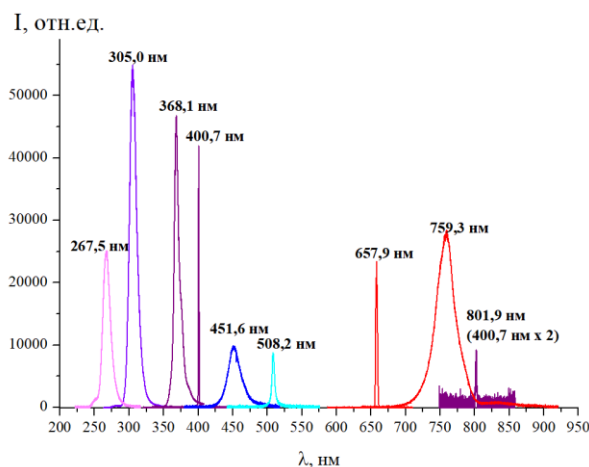


Рис. 1. Спектры лазерных и светодиодных импульсных источников возбуждения

В качестве основы одноквантового фотоприемного устройства использован фотоумножитель Hamamatsu R928 (Япония), многоканальное фотоприемное устройство разработано на базе КМОП-детектора Hamamatsu S13496 (Япония). В результате в сочетании с монохроматором M150 обеспечена возможность исследования люминесценции в монохроматорном режиме – 200-830 нм, в полихроматорном режиме – 200-1000 нм.

Разработан и изготовлен электронный блок, который обеспечивает управление источником высоковольтного напряжения для фотоумножителя, регистрацию и анализ сигнала с него. Для регистрации кинетики затухания флуоресценции в режиме время-коррелированного счета фотонов в спектрофлуориметр включена схема временной привязки и время-амплитудный преобразователь. Внедрение данного лазерного спектрофлуориметра в учебный процесс позволит поднять на современный уровень знания студентов, магистрантов и аспирантов в области аналитического спектрального оборудования со следующими техническими характеристиками:

- диапазон измеряемых времен затухания свечения: 0,2-10 000 нс;
- временное разрешение: 0,1 нс ($1 \cdot 10^{-10}$ сек);
- длины волн светодиодных источников возбуждения: 260 нм; 285 нм, 350 нм
- длины волн лазерных источников возбуждения: 405 нм; 450 нм; 515 нм; 650 нм; 780 нм;
- спектральный диапазон регистрации излучения: в монохроматорном режиме – 200-830 нм, в полихроматорном – 200-1000 нм;
- динамический диапазон по фотометрической шкале в монохроматорном режиме 10^6 .

Разработано программного обеспечения (ПО) для объединения отдельных узлов в единый программно-аппаратный комплекс. ПО спектрофлуориметра позволяет организовать управление монохроматором M150 и электронным блоком, что обеспечивает высокую степень автоматизации при регистрации и обработки стационарных спектров и кинетики затухания флуоресценции. В ПО спектрофлуориметра включен разработанный программный модуль «ФлуоТау» для анализа кинетики затухания флуоресценции, зарегистрированной по методу время-коррелированного счета одиночных фотонов. В его основе нелинейный метод наименьших квадратов. Модуль «ФлуоТау» позволяет аппроксимировать зарегистрированную кинетику затухания флуоресценции суммой до 5 экспонент, имеет широкие возможности предварительной обработки кинетики и настройки модели аппроксимации.

Качество регистрируемых по методу TCSPC кинетик затухания флуоресценции зависит от длительности и временного профиля импульсных источников, времени отклика фотодетектора, характеристик контроллера для анализа времен прилета одиночных фотонов, а

также программного обеспечения для анализа кинетики затухания флуоресценции. Для контроля стабильности работы подобного рода аппаратуры, в том числе для сравнения результатов, полученных на приборах разных производителей разумно использовать эталонные образцы с известной длительностью затухания флуоресценции. В связи с этим проведены исследования для составления набора эталонных образцов с длительностью затухания флуоресценции в нано- и микросекундном диапазоне. Основные требования к эталонному образцу – независимость длительности затухания флуоресценции от длины волны возбуждения и регистрации, высокая временная стабильность образцов. Первое условие выполняется для системы, состоящей из одного поглощающего и флуоресцирующего центра. В итоговый набор вошли красители оксазин 17, DCM, родамин 6Ж и индотрикарбоцианиновый краситель ПК1 (ПК1) в этаноле, а также раствор нового индо-трикарбоцианинового красителя ПК2 в о-дихлорбензоле. Их полосы поглощения (рисунок 2) в совокупности лежат в диапазоне 270-830 нм, который покрывает нужды для большинства флуоресцирующих молекулярных систем. Исследования спектрально-люминесцентных свойств данных красителей в соответствующих средах показали, что представленные образцы представляют собой систему, состоящую из одного поглощающего и флуоресцирующего центра. Так для всех эталонных образцов наблюдается постоянство спектра поглощения при изменении концентрации красителя. Максимум полосы поглощения оксазина 17 в этаноле располагается вблизи 550 нм, DCM в этаноле – 468 нм, родамина 6Ж в этаноле – 526 нм, ПК1 в этаноле – 745 нм, ПК2 в о-дихлорбензоле – 807 нм.

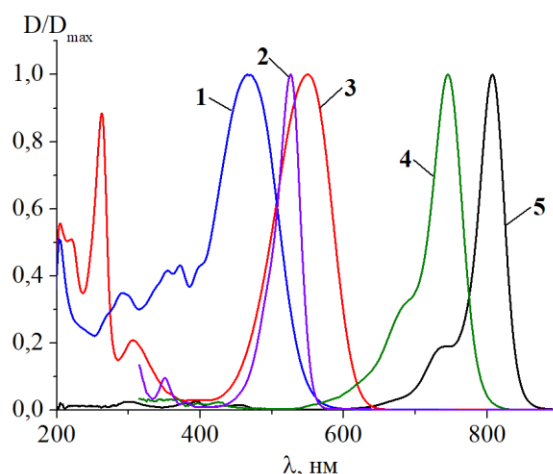


Рис. 2. Нормированные спектры поглощения растворов красителей: 1 – DCM в этаноле, 2 – родамин 6Ж в этаноле, 3 – оксазин 17 в этаноле, 4 – ПК1 в этаноле, 5 – ПК2 в о-дихлорбензоле

Исследования люминесцентных свойств эталонных образцов проводились с помощью спектрофлуориметра Fluorolog. Концентрация красителей в растворах подбиралась такой, чтобы оптическая плотность в максимуме полосы поглощения не превышала 0,1. Установлено, что форма спектра (рисунок 3), квантовый выход и длительность затухания флуоресценции у всех образцов не зависят от длины волны возбуждения. Максимум флуоресценции наблюдается на следующих длинах волн: оксазин 17 в этаноле – 641 нм; DCM в этаноле – 640 нм; родамин 6Ж в этаноле – 552 нм; ПК1 в этаноле – 773 нм; ПК2 в о-дихлорбензоле – 827 нм. Кинетика затухания флуоресценции наилучшим образом аппроксимируется одной экспонентой. Получены следующие времена затухания флуоресценции при температуре 17 °С: оксазин 17 в этаноле – 3,3 нс; DCM в этаноле – 1,5 нс, родамин 6Ж в этаноле – 4,09, ПК1 в этаноле – 1,2 нс, ПК2 в о-дихлорбензоле – 1,3 нс. Все предложенные красители продемонстрировали достаточную временную стабильность при хранении в виде порошка (месяцы и годы), и стабильность в соответствующих растворах в затемненных условиях не менее 14 суток.

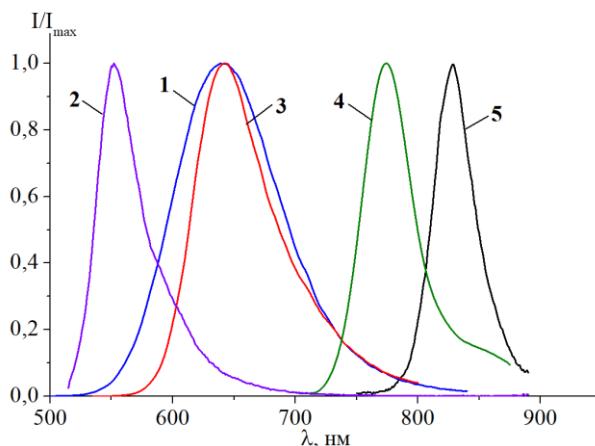


Рис. 3. Нормированные спектры флуоресценции растворов красителей: 1 – DCM в этаноле, 2 – родамин бЖ в этаноле, 3 – оксазин 17 в этаноле, 4 – ПК1 в этаноле, 5 – ПК2 в о-дихлорбензоле

Для микросекундного диапазона предложено использовать сапфир с титаном, для которого длительность затухания флуоресценции при регистрации на длине волны 740 нм при возбуждении лазерами с длиной волны излучения 405 нм, 450 нм или 510 нм составила 3,11 мкс (рисунок 4).

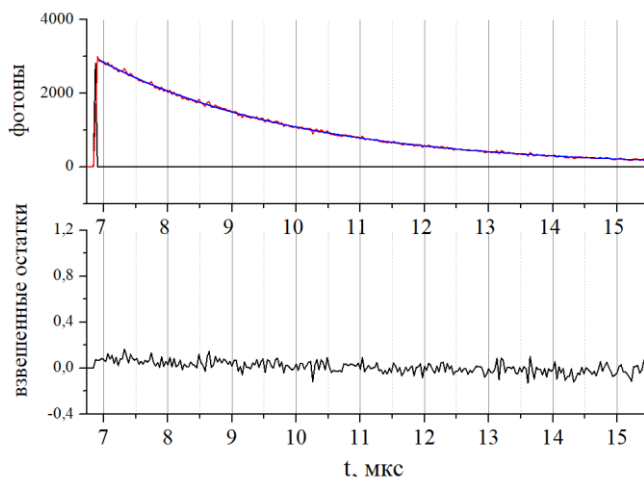


Рис. 4. Кинетика затухания флуоресценции сапфира с титаном при возбуждении лазером 510 нм и регистрации на длине волны 740 нм

Заключение

В работе представлен лазерный спектрофлуориметр для спектрально-кинетического люминесцентного анализа, который позволяет регистрировать стационарный спектр флуоресценции, кинетику затухания флуоресценции по методу время-коррелированного счета одиночных фотонов при возбуждении импульсным лазерным источником света. Режим измерения кинетики затухания флуоресценции реализован с использованием импульсных лазерных источников с субнаносекундной и пикосекундной длительностью и электроники для анализа времени прилета фотонов собственной разработки. Лазерный спектрофлуориметр по своим характеристикам соответствует зарубежным коммерческим аналогам.

Список литературы

1. Jameson D.M., Croney J.C., Moens P.D.J. Fluorescence: Basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods in Enzymology*. 2003;360:1–43.
2. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer;2006.