

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА  
ПО ИЗМЕРЕНИЮ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРОФОРА,  
В КОТОРОМ В КАЧЕСТВЕ ДЕТЕКТОРА ИСПОЛЬЗУЮТСЯ  
ЛАВИННЫЕ ФОТОДИОДЫ**

**М. Поплетеева<sup>1</sup>, Д. Ф. Далла Бетта<sup>1</sup>, Д. Стоппа<sup>2</sup>**

---

*<sup>1</sup>Department of Information Engineering and Computer Science  
University of Trento*

*<sup>2</sup>The Smart Optical Sensors and Interfaces research unit of the Center for  
Materials and Microsystems, Bruno Kessler Foundation  
Trento, Italy  
E-mail: repich@disi.unitn.it*

Последние достижения в области лавинных фотодиодов позволили им стать альтернативой традиционным детекторам, используемым во временно разрешенной флуоресцентной спектроскопии. В данной работе представлена имитационная модель флуоресцентного эксперимента, которая позволяет пред-

сказывать экспериментальные результаты при известных параметрах оборудования и биологического образца, помогает объяснять наблюдаемые эффекты, а также реализует виртуальные эксперименты.

*Ключевые слова:* лавинные фотодиоды в режиме Гейгера, флуоресцентный эксперимент, время жизни флуорофора, имитационное моделирование.

Временно разрешенная флуоресцентная спектроскопия используется при изучении структуры молекулярных система и динамических процессов, происходящих в них [1]. Это возможно благодаря высокой чувствительности времени жизни флуорофора к физическим и химическим свойствам окружающей среды [1]. Однако точное детектирование времени жизни является сложной задачей, так как время затухания флуоресценции лежит в наносекундном диапазоне.

Свойства лавинных фотодиодов в режиме Гейгера (Geiger mode APD или Single Photon Avalanche Diode – SPAD) делают эти оптические детекторы хорошей альтернативой традиционным фото-умножителям и микроканальным пластинам [2]. КМОП технология позволяет интегрировать лавинные фотодиоды в режиме Гейгера (ГЛФД) и электронные схемы на одной и той же подложке и предоставляет преимущества во временной и шумовой характеристиках. Интеграция схемы обработки сигналов и детектора на одной и той же микросхеме позволяет использовать такие детекторы без дополнительного внешнего оборудования [3].

Новые ГЛФД-детекторы с улучшенными характеристиками изготавливаются ежегодно. Однако проектировщики используют различные метрики, тогда как важность той или иной характеристики детектора зависит от области его применения. Валидация и оптимизация характеристик ГЛФД должна производиться в тесной связи с анализом специфической системы, в которой будет использоваться этот детектор.

В данной работе представлена имитационная модель, описывающая типичный временно разрешенный флуоресцентный эксперимент с ГЛФД в качестве детектора. Модель реализует все важнейшие части такого эксперимента, начиная с возбуждающего излучения, продолжая фотофизическими процессами, происходящими внутри биологического образца и заканчивая детектором и выходной электроникой.

## ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ С РАЗРЕШЕНИЕМ ПО ВРЕМЕНИ

**Время-коррелированный счет одиночных фотонов (ВКСОФ).** Образец возбуждается импульсным источником света и записывается время прихода первого флуоресцентного фотона. Кривая затухания флуоресценции получается путем детектирования времен прихода большого числа фотонов. Интенсивность возбуждающего излучения устанавливается таким образом, чтобы вероятность обнаружить фотон после одного светового импульса была меньше либо равна 1%. В противном случае кривая затухания может быть искажена в сторону более коротких времен из-за эффекта наложения импульсов (pile-up effect) [1]. В случае моноэкспоненциального затухания флуоресценции время жизни может быть вычислено как наклон кривой затухания в логарифмической шкале:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \Rightarrow \tau - \text{это наклон } \log I(t) \text{ по } t. \quad (1)$$

**Временная селекция.** Образец так же возбуждается импульсным источником света. Записывается число фотонов, задетектированных в течении двух или более временных интервалов. В случае моноэкспоненциального затухания, достаточно двух временных интервалов одинаковой длины. Время жизни в этом случае вычисляется по следующей формуле:

$$\tau = \frac{T_1 - T_2}{\ln(V_2/V_1)}, \quad (2)$$

где  $T_1$  и  $T_2$  – временная задержка между возбуждающим импульсом и началом первого и второго временного интервалов, соответственно;  $V_1$  и  $V_2$  – интегральная интенсивность (число фотонов) в этих временных интервалах [4].

## ЛАВИННЫЕ ФОТОДИОДЫ В РЕЖИМЕ ГЕЙГЕРА

Принцип работы идеального ГЛФД следующий. В состоянии покоя ток через прибор не течет и напряжение обратного смещения выше пробойного. Поглощение единичного фотона в обеднённой области  $p-n$  перехода создает электронно-дырочную пару, которая мгновенно ускоряется. За счет ударной ионизации возникает самоподдерживающаяся лавина. Ток мгновенно возрастает до некоторого фиксированного значения, зависящего от напряжения обратного смещения и сопротивления диода. Внешняя цепь гашения снижает приложенное напряжение обратного смещения до значения ниже напряжения пробоя, что приводит к гашению лавины. Рабочий цикл завершается восстановлением напряжения обратного смещения до первоначального значения. Выход детектора представляет собой импульс тока с фиксированной пиковой амплитудой, где передний фронт импульса указывает время прихода фотона. Детектор не чувствителен к фотонам, приходящим в промежуток времени между началом лавины и восстановлением напряжения обратного смещения до первоначального значения. Этот период называется *мертвым временем* ГЛФД.

Очевидно, что реальные ГЛФД отличаются от идеальных. Первой характеристикой несовершенства является *разрешающая способность по времени* или *дрожание развертки* – это статистическое распределение задержки между действительным временем прихода фотона и передним фронтом импульса тока. Следующая характеристика реальных ГЛФД – это *вероятность детектирования фотонов* (ВДФ), которая определяется как отношение числа приходящих фотонов к числу импульсов на выходе детектора. ВДФ зависит от длины волны фотона и напряжения обратного смещения. Внутренний шум прибора или *скорость счета теневых фотонов* (ССТФ) это число инициирования лавин в единицу времени в детекторе, находящемся в темноте. Это характеристика, очень сильно влияющая на производительность детектора. ССТФ зависит от трех составляющих: термогенерации носителей заряда, электронного туннелирования из валентной зоны в зону проводимости и *остаточных импульсов* (afterpulsing), которые возникают в результате повторного инициирования лавины носителями заряда, высвобожденными из ловушек. Термальная составляющая может быть уменьшена охлаждением детектора, но это увеличивает время жизни ловушек и, следовательно, вероятность остаточных импульсов. Вероятность остаточных импульсов может быть уменьшена введением *времени задержки* (hold-off time),

что ведет к ухудшению производительности по времени; либо уменьшением напряжения обратного смещения, что снижает эффективность детектирования фотонов.

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Представляемая в данной работе модель флуоресцентного эксперимента состоит из набора независимых блоков, каждый из которых моделирует определенную часть эксперимента. Схематическая диаграмма модели со входами и выходами отдельных блоков представлена на рисунке 1. Все экспериментальные параметры либо оценки этих параметров являются входными параметрами соответствующих блоков. Внутренним параметром системы является список фотонов на каждом этапе. Длина этого списка и характеристики каждого фотона меняются в течение моделирования. Выход имитационной модели представляет собой кривую затухания флуоресценции. Более детальная информация может быть найдена в [5].

В предыдущих работах была протестирована способность представленной системы моделировать различные подходы временно разрешенной флуоресцентной спектроскопии (время-коррелированный счет одиночных фотонов и временная селекция) [6]; различные источники света (Picoquant LDH-P-C-470 импульсный диодный лазер [6] и матрица микросветодиодов [7]); и различные лавинные фотодиоды, работающие в режиме Гейгера [6, 7]. Также модель была использована для изучения временной фильтрации возбуждающего излучения [8]. Ниже мы продемонстрируем применимость модели для объяснения причин искажений в экспериментальных данных. В данном случае опыт был поставлен при очень высоких уровнях интенсивности окружающего света, что вызвало эффект наложения импульсов.

Раствор флуорофора был помещен в непосредственной близости от коммерческого ГЛФД (Micro Photon Devices серии PDM). Кривая затухания флуоресценции реконструировалась внешним модулем ВКСОФ (PicoNap 300). В качестве источника возбуждающего света был использован диодный лазер (Picoquant LDH-P-C-470) с частотой 1МГц. Так как не было использовано никаких оптических фильтров и лазер был направлен прямо на детектор, то ГЛФД работал в режиме насыщения. Полученные экспериментальные данные представлены на рис. 2, а.

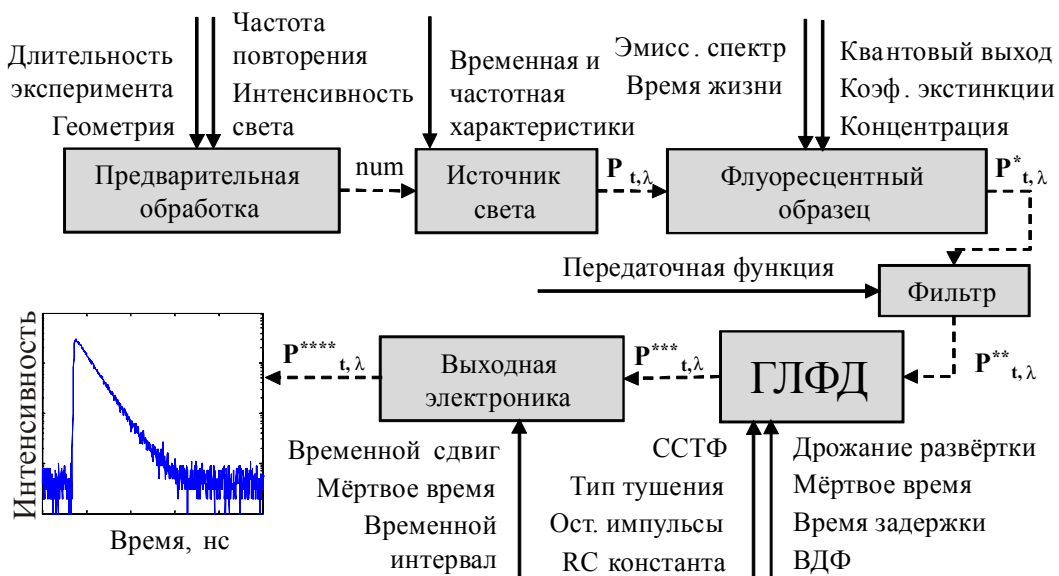


Рис. 1. Схематическая диаграмма имитационной модели. Сплошные линии – входные параметры, штрихованные линии – внутренние параметры системы

Вначале была рассмотрена кривая лазерного излучения без флуоресценции. Провал после лазерного пика может быть объяснен присутствием в системе мертвого времени ВКСОФ-модуля, который работает в мультифотонном режиме. Значение этого времени, полученное из эксперимента, равняется 85.5 нс. Чтобы объяснить такие артефакты, как увеличение числа отсчетов к концу мертвого времени ВКСОФ модуля и затухание с большой временной константой после окончания этого периода вместо постоянного уровня шума, был проведен ряд имитационных экспериментов. Часть полученных результатов представлена на рис. 2, б.

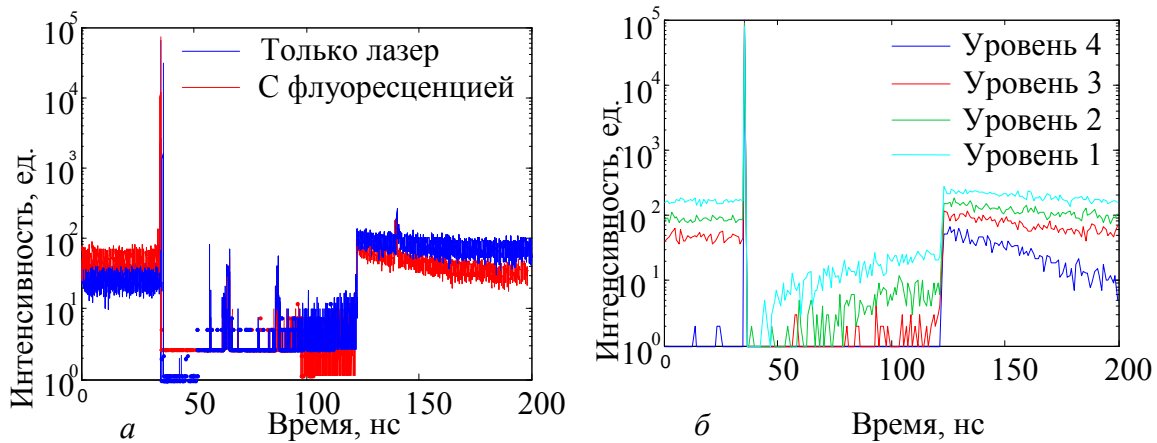


Рис. 2. а) Экспериментальные кривые при эффекте наложения импульсов; б) Моделирование детектирования лазерного излучения при различной интенсивности окружающего света. Уровень 1 < уровень 2 < уровень 3 < уровень 4

Первый тип описанных выше артефактов объясняется тем, что в идеале лазерные фотоны, детектируемые в момент времени 35 нс, начинают рабочий цикл и после этого система не может детектировать другие фотоны в течение 85.5 нс. Однако существует вероятность детектирования фотона из окружающей среды до наступления лазерного импульса. В этом случае мертвый период системы закончится раньше, чем 120.5 нс (конец мертвого периода, вызванный лазерным импульсом) и система будет вновь готова к детектированию. Чем выше интенсивность окружающего света, тем выше вероятность детектирования фотона из окружающей среды. Это и обуславливает увеличение числа отсчетов к концу мертвого времени ВКСОФ-модуля. Второй тип артефактов является следствием остаточных импульсов.

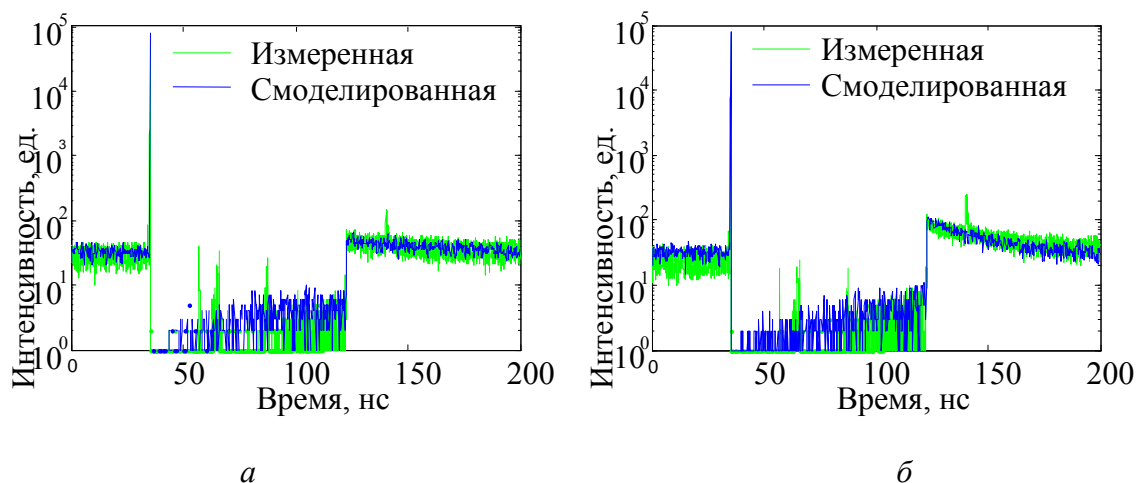


Рис. 3. Измеренные и смоделированные кривые лазерного излучения (а) и затухания флуоресценции (б) при высокой интенсивности окружающего света

На последнем этапе мы включили в моделирование флуоресценцию, для того чтобы полностью смоделировать интересующую нас кривую затухания. Результаты представлены на рис. 3. Как видно из рисунка, смоделированная кривая повторяет форму экспериментальной везде, кроме небольших пиков по всему периоду детектирования. Эти пики являются следствием наводок в кабеле синхронизации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Lakowicz, J. R.* Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. Springer, 2006. 954 p.
2. *Becker, W.* Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques / W. Becker. Berlin: Springer, 2005. 401 p.
3. *Bertone, N.* Overview of photon counting detectors based on CMOS processed single photon avalanche diodes (SPAD), InGaAs APD's, and novel Hybrid (Tube + APD) detectors / N. Bertone, R. Biasi, B. Dion // Proc. SPIE 2005. Vol. 5726. P. 153–163.
4. *Gerritsen, H. C.* Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition speed, photon economy and lifetime resolution / H. C. Gerritsen, M. A. H. Asselbergs, A. V. Agronskaia, W. G. J. H. M. van Sark // J. Microsc. 2002. Vol. 206. Pt. 3. P. 218–224.
5. LiFES – Simulation of lifetime fluorescence experiment based on SPAD detector: <http://lifef.fbk.eu>.
6. *Repich, M.* Simulation modelling for the analysis and the optimal design of SPAD detectors for time-resolved fluorescence measurements / M. Repich, D. Stoppa, L. Pancheri, G.-F. Dalla Betta // Proc. SPIE, Prague 2009. Vol. 7355. P. 735500.
7. *Repich, M.* / Simulation modelling of a micro-system for time-resolved fluorescence measurements / M. Repich, D. Stoppa, G.-F. Dalla Betta // Proc. SPIE, Brussels 2010. Vol. 7726. P. 77261I.
8. *Repich, M.* Analysis of time filtering of excitation light in fluorescence measurement with simulation modelling / M. Repich, D. Stoppa, G.-F. Dalla Betta // Proc. ITEDS'2010, Minsk, 2010. Vol. 3:81.