

УДК 535.37

ЛАЗЕРНЫЙ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТР ДЛЯ СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКОГО ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Самцов М. П.¹, Тарасов Д. С.^{1,2}, Радзько А. Е.¹, Шевченко К. А.¹, Кирсанов А. А.², Воропай Е. С.²

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко»
Белорусский государственный университет
Минск, Республика 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.

Ключевые слова: спектрофлуориметр, спектрально-кинетический люминесцентный анализ, время-коррелированный счет одиночных фотонов.

LASER SPECTROFLUOROMETER FOR SPECTRAL-KINETIC LUMINESCENT ANALYSIS

Samtsov M.¹, Tarasov D.^{1,2}, Radzko A.¹, Shevchenko K.¹, Kirsanov A.², Voropay E.²

¹A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University
²Belarusian State University
Minsk, Republic of 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.

Key words: spectrofluorometer, spectral-kinetic luminescence analysis, time-correlated single photon counting.

Адрес для переписки: Д. С. Тарасов, ул. Курчатова 7, 220045 г. Минск, Республика Беларусь
e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

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 [1]. 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, исследованиях позволяет получать существенно более обширную информацию об изучаемых системах по сравнению с чисто спектральными измерениями [1]. 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 широкопо-

лосными 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.

Разработанный лазерный спектрофлуориметр позволяет регистрировать стационарный спектр флуоресценции и кинетику затухания флуоресценции по методу время-коррелированного счета одиночных фотонов 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 трех 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 с микросекундного или наносекундного диапазонов.

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 – 0,2–10000 нс; временное разрешение – 0,1 нс; 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 и в полихроматорном 200–1000 нм; динамический диапазон по фотометрической шкале в монохроматорном режиме 10^6 .

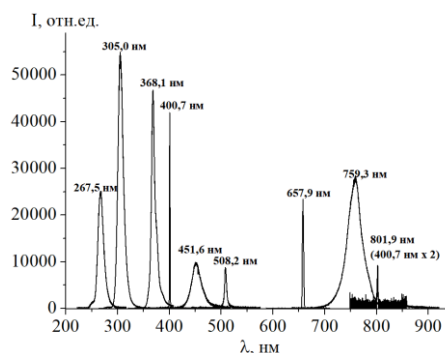


Рисунок – Спектры лазерных и светодиодных импульсных источников возбуждения

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.

Литература

1. Jameson, D. M. Fluorescence: Basic concepts, practical aspects, and some anecdotes / D. M. Jameson, J. C. Croney, P. D. J. Moens // *Methods in Enzymology*. – 2003. – V. 360. – P. 1–43.