

Кинетический спектрофлуориметр для анализа объектов в физике и биологии

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⁾

¹⁾ *Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь,*

e-mail: samtsov@mail.ru

²⁾ *Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

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; длительность затухания флуоресценции; время-коррелированный счет одиночных фотонов; органические красители.

Kinetic spectrofluorimeter for the analysis of objects in physics and biology

M. P. Samtsov¹⁾, D. S. Tarasau^{1, 2)}, A. E. Radzko¹⁾, K. A. Shevchenko¹⁾,
A. A. Kirsanov²⁾, N. V. Laboda^{1, 2)}, E. S. Voropay²⁾

¹⁾ *A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus, e-mail: samtsov@mail.ru*

²⁾ *Belarusian State University, Minsk, Belarus*

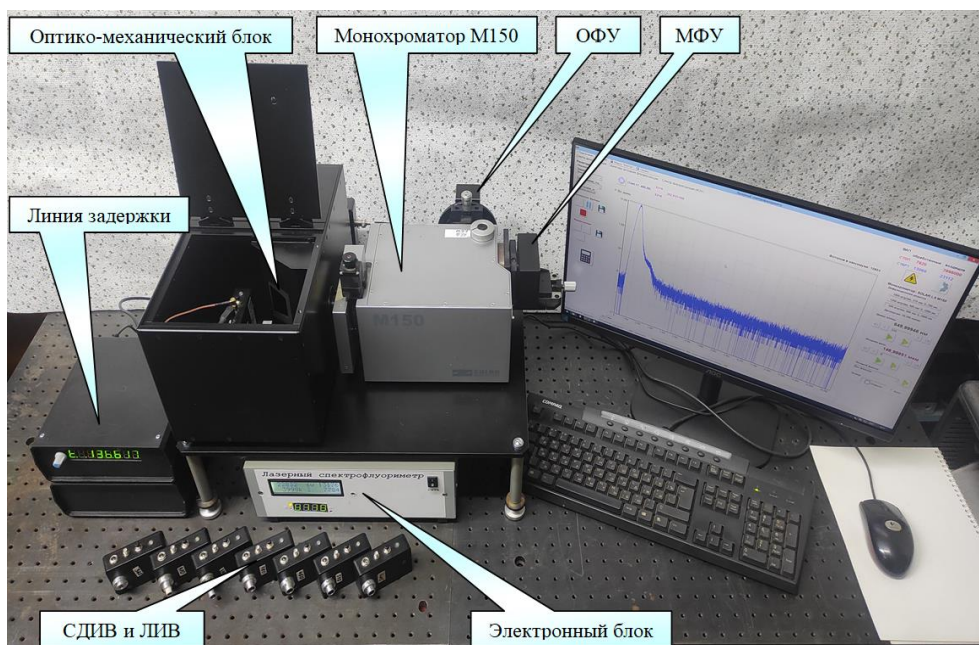
The laser spectrofluorometer for spectral-kinetic luminescence analysis has been developed and manufactured, which allows recording a stationary fluorescence spectrum, fluorescence decay kinetics using the time-correlated single photon counting method when excited by a selected pulsed light source.

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

Использование спектрально-кинетического люминесцентного анализа в фотофизических, биологических и других исследованиях позволяет получать существенно более обширную информацию об изучаемых системах по сравнению с исследованиями только с помощью стационарной флуоресцентной спектроскопии [1, 2]. 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 оказываются кинетические характеристики испускания исследуемых объектов. На базе измерений спектрально-кинетических параметров обеспечивается изучение молекулярной структуры белков и мембран, механизмов переноса ионов в мембранах, механизмов аллергических реакций

и многие другие. Наблюдается рост интереса к методикам, основанным на измерении длительности затухания флуоресценции экзогенных и эндогенных флуорофоров для медицинских приложений. Высокая чувствительность люминесцентного анализа позволяет определять с его помощью предельно малые концентрации биологически важных веществ, определять патологические изменения биотканей и биологических организмов.

Сегодня на рынке есть несколько производителей спектрофлуориметров с временным разрешением. Это достаточно дорогое оборудование, требующее высокой квалификации специалистов при его эксплуатации и обслуживании, что существенно ограничивает их использование в учебных целях. В данной работе представлены описание и характеристики разработанного и созданного лазерного спектрофлуориметра для научно-учебных целей в области спектрально-кинетического люминесцентного анализа в экспериментальной физике и биологии. Спектрофлуориметр позволяет регистрировать стационарный спектр флуоресценции и кинетику затухания флуоресценции образцов при возбуждении импульсным источником света. Регистрация кинетики затухания флуоресценции реализована по методу время-коррелированного счета одиночных фотонов.



Внешний вид лазерного спектрофлуориметра

При построении прибора в основу положен модульный принцип, что позволяет легко реализовать нужную конфигурацию спектрофлуориметра, которая требуется для выполнения конкретных исследований. С другой стороны, посредством совершенствования отдельных ключевых узлов можно изменять параметры аппаратуры в целом, заменой узлов со схожим функциональным назначением, но существенно иными параметрами. Принципиальная схема спектрофлуориметра состоит из трёх функционально законченных частей (рисунок): опико-механического блока, электронного блока и персональной электронно-вычислительной машины для выполнения специального программного обеспечения по управлению спектрофлуориметром

и анализу кинетики затухания флуоресценции. В состав спектрофлуориметра входят сменные импульсные лазерные и светодиодные источники возбуждения (ЛИВ и СДИВ), камера образцов, монохроматор, одноквантовое фотоприемное устройство (ОФУ), многоканальное фотоприемное устройство (МФУ), управляемая линия задержки (УЛЗ). В спектрометре использованы несколько лазерных и светодиодных источников света собственной разработки, которые позволяют осуществлять возбуждение флуоресценции в спектральном диапазоне 250–760 нм. Импульсный режим источников света реализован посредством оригинального схемотехнического решения. Созданные импульсные источники могут работать в пико- и нано- режимах, с длительностью импульса 0,07 – 0,3 нс или 1,5 – 3,0 нс. Реализована возможность выбора частоты следования импульсов от килогерца до нескольких мегагерц, что необходимо для обеспечения возможности исследования кинетики затухания люминесценции в микросекундном или наносекундном диапазонах.

Оптико-механический блок включает кюветное отделение, монохроматор-спектрограф M150 (Solar LS, Беларусь), фотоприемные устройства. В качестве основы одноквантового фотоприемного устройства использован фотоумножитель Hamamatsu R928 (Япония), многоканальное фотоприемное устройство разработано на базе КМОП-детектора Hamamatsu S13496 (Япония). Электронный блок выполняет функции блока питания для источников возбуждения, 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 (ВАП).

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

Оптическая схема и основные узлы спектрофлуориметра разрабатывались таким образом, чтобы обеспечить технический уровень, сопоставимый с современными отечественными и зарубежными аналогами. Основные характеристики спектрофлуориметра следующие: диапазон измеряемых времен затухания свечения – 0,2–10 000 нс; временное разрешение – 0,1 нс; длины волн светодиодных источников возбуждения – 267,5 нм, 305,0 нм и 368,1 нм; длины волн лазерных источников возбуждения – 400,7 нм, 451,6 нм, 508,2 нм, 657,9 нм и 759,3 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 .

Для верификации работы спектрофлуориметра и определения его временного разрешения предложен набор эталонных образцов с длительностью затухания флуоресценции в нано- и микросекундном диапазонах. Поиск подходящих образцов осуществлялся в соответствии с требованиями, которые сформулированы в работе [3]. Основное требование при выборе образцов такого рода – наличие в системе одного поглощающего и флуоресцирующего центра. В итоговый набор вошли красители оксазин 17, 4-дициано-метилден-2-метил-6-(*p*-(диметиламино)стирил)-4Н-пиран (DCM), родамин 6Ж, индотрикарбоцианиновый краситель ИТК1 (ИТК1) в этаноле, криптоцианин в метаноле, эритрозин-Б в дистиллированной воде и новый индотрикарбоцианиновый краситель ИТК2 в *o*-дихлорбензоле.

Для приготовления растворов использованы дистиллированная вода, а также органические растворители (этанол, метанол и *o*-дихлорбензол. Спектры поглощения красителей зарегистрированы с помощью спектрофотометров PV 1251B (“Солар”, Беларусь) и Photon RT (“Эссент Оптикс”, Беларусь). Флуоресцентные характеристики красителей исследованы с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Scientific, США-Франция-Япония). Концентрация красителей в растворах подбиралась такой, чтобы оптическая плотность в максимуме полосы поглощения не превышала 0,1. Для каждого эталонного образца длительность затухания флуоресценции измерялась по 10 раз для исключения случайной погрешности в ходе опыта.

Полосы поглощения выбранных красителей находятся в диапазоне 270–830 нм, флуоресценции 500–900 нм. Максимум полосы поглощения оксазина 17 в этаноле расположен вблизи 550 нм, DCM в этаноле 468 нм, родамина 6Ж в этаноле 526 нм, ИТК1 в этаноле 742 нм, ИТК2 в *o*-дихлорбензоле 807 нм, криптоцианина в метаноле 708 нм, эритрозина-Б в воде 529 нм.

Установлено, что для каждого из эталонных образцов форма спектра и длительность затухания флуоресценции не зависят от длины волны возбуждения. Максимум спектра флуоресценции расположен на следующих длинах волн: оксазин 17 в этаноле – 641 нм; DCM в этаноле 640 нм; родамин 6Ж в этаноле – 552 нм; ИТК1 в этаноле – 773 нм; ИТК2 в *o*-дихлорбензоле – 827 нм; криптоцианин в метаноле – 718 нм; эритрозин-Б в воде – 552 нм. Спектр возбуждения флуоресценции совпадает по форме со спектром поглощения и не изменяется от длины волны регистрации. Кинетика затухания флуоресценции наилучшим образом аппроксимируется одной экспонентой. На спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Scientific, США-Франция-Япония) были получены следующие времена затухания флуоресценции при температуре 20 °С: оксазин 17 в этаноле $3,26 \pm 0,01$ нс; DCM в этаноле $1,45 \pm 0,01$ нс, родамин 6Ж в этаноле $4,09 \pm 0,01$ нс, ИТК1 в этаноле $1,11 \pm 0,01$ нс, ИТК2 в *o*-дихлорбензоле $1,27 \pm 0,01$ нс. Такие спектрально-люминесцентные свойства красителей в соответствующих средах свидетельствуют о том, что каждый из образцов содержит один поглощающий и флуоресцирующий центр. 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. В связи с этим выбранные растворы красителей подходят для использования в качестве эталонных образцов длительности затухания флуоресценции.

Проведены измерения длительности затухания флуоресценции эталонных образцов на новом лазерном спектрофлуориметре. В пределах случайной погрешности измеренные длительности затухания флуоресценции совпадают со значениями, полученными на спектрофлуориметре Fluorolog-3, а также с литературными данными (таблица). В зависимости от образца различия составляют от 0.5 до 4.3 %. По данным [3], разброс времен затухания флуоресценции стандартов от среднего значения, которые измерены в разных лабораториях, составлял от 1.2 до 6 %.

Длительность затухания флуоресценции эталонных образцов при 20 °С

Краситель, растворитель	Спектрофлуориметр Fluorolog-3	Новый лазерный спектрофлуориметр	Литературный источник
Оксазин-17, этанол	$\tau = 3,401 \pm 0,005$ нс $\chi^2 = 1,09$	$\tau = 3,383 \pm 0,020$ нс $\chi^2 = 1,13$	–
ДСМ, этанол	$\tau = 1,412 \pm 0,006$ нс $\chi^2 = 1,07$	$\tau = 1,405 \pm 0,015$ нс $\chi^2 = 1,11$	–
Родамин 6Ж, этанол	$\tau = 4,088 \pm 0,011$ нс $\chi^2 = 1,11$	$\tau = 4,095 \pm 0,014$ нс $\chi^2 = 1,16$	–
ИТК1 (НТС), этанол	$\tau = 1,052 \pm 0,009$ нс $\chi^2 = 1,09$	$\tau = 1,067 \pm 0,012$ нс $\chi^2 = 1,17$	–
ИТК2, о-дихлорбензол	$\tau = 1,269 \pm 0,008$ нс $\chi^2 = 1,10$	$\tau = 1,256 \pm 0,014$ нс $\chi^2 = 1,14$	–
Криптоцианин, метанол		$\tau = 10,203 \pm 0,009$ нс $\chi^2 = 1,20$	$0,18 \pm 0,04$ нс (20 °С) [4]
Эритрозин-Б, вода		$\tau = 0,096 \pm 0,010$ нс $\chi^2 = 1,21$	$0,089 \pm 0,003$ нс (20 °С) [3]

Принимая во внимание, что с помощью разработанного спектрофлуориметра с приемлемой точностью (10 %) определена длительность затухания флуоресценции эритрозина-Б в этаноле, которая составляет $0,089 \pm 0,003$ нс [3], установленное значение можно принять в качестве нижней границы диапазона измеряемых времен затухания, а также в качестве оценки временного разрешения.

Разработанный лазерный спектрофлуориметр предназначен для проведения научных исследований и использования в образовательном процессе для подготовки специалистов в практикумах по естественно-научным дисциплинам, для обучения современным методикам спектрально-кинетического люминесцентного анализа. Соответствуя аналогичным изделиям зарубежных фирм (Horiba, Япония; Edinburg Instruments Ltd., Великобритания; PicoQuant, Германия), прибор имеет значительно меньшую стоимость.

Библиографические ссылки

1. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer; 2006.
2. Valeur B., Brochon J. C. (ed.). New trends in fluorescence spectroscopy: applications to chemical and life sciences. Springer Science & Business Media, 2012.
3. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy / N Boens [et al.] // Analytical chemistry. 2007. Vol. 79, №. 5. P. 2137–2149.
4. Harriman A. In vitro photodynamic activity of kryptocyanine / A. Harriman, G. Luengo, K. Gulliya S. // Photochemistry and photobiology. 1990. V. 52, №. 4. С. 735–740.