

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИЧЕСКАЯ ОПТИКА

- 3 Оптимизация высокочувствительного лазерного флуоресцентного метода**
Козулин Р.А.
- 8 Комплементарные последовательности Голея в многощелевой дисперсионной оптической спектроскопии**
Кузнецов А.В., Мартынович Е.Ф.
- 12 Метод интегральных уравнений в задаче дифракции волны на решетке из параллельных диэлектрических брусьев с сечением правильного многоугольника**
Соловьев А.С., Нефедов И.С.
- 18 Плазмонный резонанс в наноструктурах золото–фуллерен**
Шпилевский Э.М., Замковец А.Д.

РАСЧЕТ, ПРОЕКТИРОВАНИЕ И ПРОИЗВОДСТВО ОПТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

- 22 Оптический дефлектор корректора наклона волнового фронта**
Слободян М.С., Слободян С.М., Цупин А.А.

ГОЛОГРАФИЯ

- 28 Материалы с диффузионным усилением для оптической записи информации и их исследование голографическим методом**
Вениаминов А.В., Бандюк О.В., Андреева О.В.
- 34 Оптическое формирование рельефных голограмм из фотополимеризующихся композиций с неполимеризационно-способными добавками**
Батенькин М.А., Менсов С.Н., Романов А.В.

ОПТИЧЕСКОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ И ТЕХНОЛОГИЯ

- 37 Сопряжение звездного интерферометра с астрономическим телескопом для контроля фазирования при апертурном синтезе**
Серегин А.Г., Смирнов А.П., Серегин Д.А., Багров А.В.
- 45 Математическое моделирование входных сигналов океанологических лидаров**
Копилевич Ю.И., Сурков А.Г.

- 52 **Координатно-чувствительные устройства на основе анизотропных оптикотермоэлементов**
Ащеулов А.А.
- 59 **Матричный преобразователь инфракрасных изображений в видимые на основе волноводных микрорезонаторов**
Пилипович В.А., Есман А.К., Гончаренко И.А., Кулешов В.К.

ОПТИЧЕСКОЕ МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ И ТЕХНОЛОГИЯ

- 65 **Исследование влияния взаимодействия каналов микроканальной пластины на контраст изображения**
Беркин А.Б., Васильев В.В.
- 69 **Исследование люминесценции оптической керамики $\text{Nd}^{3+}:\text{Y}_2\text{O}_3$**
Осипов В.В., Соломонов В.В., Расулева А.В., Иванов М.Г., Орлов А.Н.

ИНФОРМАЦИЯ

- 74 **Международная конференция “Оптоинформатика-2008”**
- 75 **XIII Международная конференция “Оптика лазеров-2008”**
- 76 **XIII International Conference “Laser Optics-2008”**
- 77 **Коллективная монография “Оптика наноструктур”**
- 78 **Монография “Оптические методы визуализации газовых потоков”**
- 79 **К сведению авторов “Оптического журнала”**

Сдано в набор 05.02.08. Подписано в печать 00.00.08. Формат бумаги 60×84/8.

Бумага офсетная № 1. Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная.

Заказ № 00. Отпечатано в ООО «ЦТТ». Тираж 300 экз. Цена подписная.

Адрес типографии: 199034, Санкт-Петербург, Биржевая линия, д. 16.

Качество графических материалов соответствует представленным оригиналам.

Научный редактор **О. Н. Кононова**

Корректор **Э.А. Рождественская**

УДК 535.372; 543.423

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЛАЗЕРНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА

© 2008 г. Р. А. Козулин, канд. техн. наук

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

E-mail: rom-kn@mail.ru

Исследован процесс фотораспада под воздействием лазерного излучения флуоресцеина, электрофоретически перемещающегося в тонком кварцевом капилляре. Показано, что фотораспад красителей снижает чувствительность измерений и накладывает ограничение на мощность возбуждающего излучения.

Коды OCIS: 260.2510, 170.2520, 170.6510.

Поступила в редакцию 21.08.2007.

Введение

Флуоресцентные методы анализа в силу высокой чувствительности нашли широкое применение в иммунодиагностике, проточной цитометрии, хроматографии и капиллярном электрофорезе [1–3]. Для увеличения чувствительности этих методов были предприняты попытки увеличить число молекул красителя, прикрепляемых к исследуемому компоненту. Однако с ростом числа прикрепленных молекул наступало концентрационное тушение, квантовая эффективность падала и сигнал флуоресценции в итоге был эквивалентен двум-трем молекулам красителя, в то время как к реагенту прикреплялось более 30 молекул [4]. Увеличение сигнала флуоресценции можно получить, повышая мощность возбуждающего света. Но это может вызвать насыщение возбужденного состояния молекулы и нелинейную зависимость интенсивности флуоресценции от мощности возбуждения [5]. Кроме того, свойство красителей распадаться под действием света приводит к тому, что флуоресцирующее вещество может в значительной степени израсходоваться при измерении, что приведет к заниженной величине полезного сигнала [6]. В силу этого мощность возбуждающего излучения необходимо выбирать исходя из условий эксперимента.

В настоящей работе изучался фотораспад красителя в приборе капиллярного электрофореза, оснащенный лазерным флуориметрическим детектором. Показана методика определения оптимальной мощности лазерного излучения применительно для анализа ДНК методом капиллярного электрофореза.

Фотораспад красителя при его движении через зону облучения

В системах капиллярного электрофореза (КЭ) время взаимодействия излучения лазера с веществом может быть относительно длительным, вследствие чего фотораспад красителей способен заметно снизить сигнал пробы. Рассмотрим, как сказывается фотораспад на величине полезного сигнала.

Предположим, что флуоресцирующее вещество разлагается с квантовым выходом

$$Q_d = k_d/k_a, \quad (1)$$

где k_d – скорость фотораспада молекул, k_a – скорость поглощения света. Пусть интенсивность возбуждающего света равна I_0 квант/с на 1 см^2 сечения пучка. Тогда для разбавленного раствора при отсутствии насыщения количество поглощенных квантов молекулой за с^{-1} составит $3,8 \times 10^{-21} \varepsilon c I_0$, где c – концентрация (моль/л), ε – молярная экстинкция, и относительную скорость разложения за интервал времени dt можно записать в виде [7]

$$\frac{1}{c} \frac{dc}{dt} = 3,8 \times 10^{-21} \varepsilon I_0 Q_d. \quad (2)$$

После перегруппировки, интегрирования и подстановки граничных условий ($c = c_0$ при $t = 0$) получаем

$$c = c_0 \exp(-3,8 \times 10^{-21} \varepsilon I_0 Q_d t), \quad (3)$$

где c_0 и c – начальная и конечная концентрации соответственно.

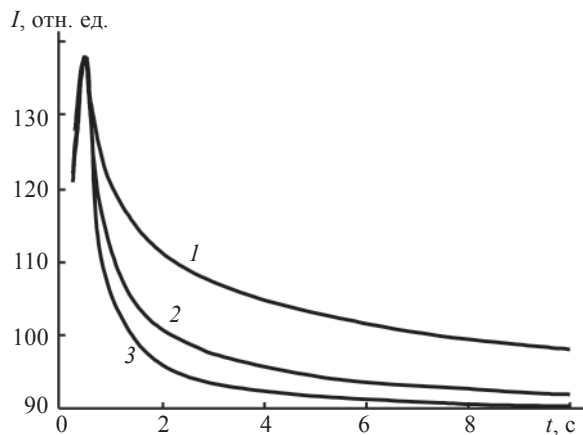


Рис. 1. Кривые распада флуоресцеина при разной мощности облучения. 1 – $P = 200$, 2 – 1000, 3 – 2000 Вт/см².

На рис. 1 показаны кривые фотораспада водного раствора флуоресцеина при возбуждении его ион-аргоновым лазером ($\lambda = 488$ нм) мощностью 1, 5 и 10 мВт. Излучение фокусировалось в пятно диаметром 25 мкм. Для устранения диффузии молекул фотораспад красителя замерялся в 6%-ном геле на основе полидиметилакриламида (ПДМА).

Перейдя к скорости поглощения отдельной молекулы, определяемой как $k_a = \sigma I_0 = 3,8 \times 10^{-21} \varepsilon I_0$, и заменив в (3) Q_d на k_d/k_a , после сокращения можно записать зависимость относительной концентрации (или вероятности выживания молекулы) от времени как

$$c/c_0 = \exp(-t/\tau_d), \quad (4)$$

где $\tau_d = 1/k_d$ – среднее время фотораспада.

Таким образом, в неподвижном облучаемом образце при равномерном освещении и отсутствии диффузии количество неразрушенных молекул и, следовательно, флуоресценция со временем уменьшаются экспоненциально. Скорость фотораспада красителя в нашем случае, когда интенсивность света не насыщает возбужденное состояние, пропорциональна интенсивности возбуждающего света.

В проточной системе при постоянной скорости потока пробы уровень флуоресценции не изменяется, так как взамен распавшихся молекул подходят новые. Рассмотрим прохождение раствора красителя через луч лазера и допустим, что сечение луча имеет прямоугольную форму (рис. 2). В случае фотораспада концентрация флуорофора на выходе облучаемой зоны (c) будет ниже концентрации на входе (c_0). Интенсивность флуоресценции будет зависеть от длительности нахождения пробы в луче лазера τ_L .

Для определения этой зависимости выделим в объеме тонкий слой, эквивалентный временному

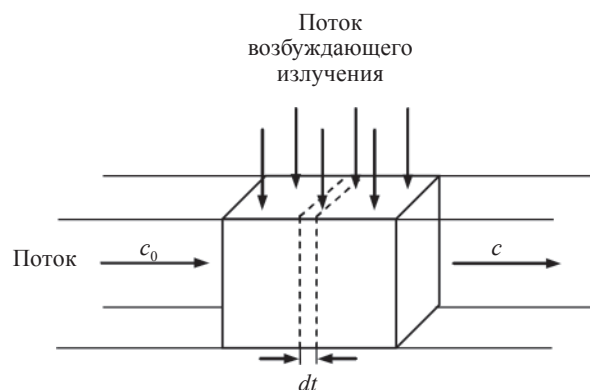


Рис. 2. Вид облучаемой лазером зоны.

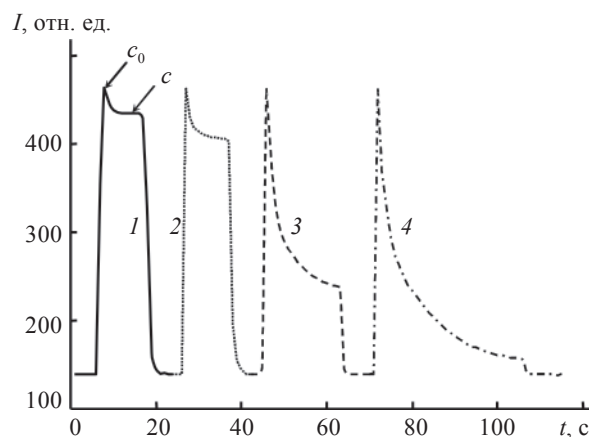


Рис. 3. Уменьшение сигнала флуоресценции при уменьшении скорости движения красителя в капилляре. Скорость пробы красителя в капилляре (начиная с левого пика) 0,32, 0,16, 0,032 и 0,0032 мм/с. 1 – $\tau_L/\tau_d = 0,2$, 2 – 0,4, 3 – 2, 4 – 20.

интервалу dt . За это время концентрация изменится согласно (4). Чтобы определить общую долю неразложившихся молекул при течении пробы, проинтегрируем правую часть (4)

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{\tau_L} \int_0^{\tau_L} \exp(-t/\tau_d) dt = \frac{1 - \exp(-\tau_L/\tau_d)}{\tau_L/\tau_d}, \quad (5)$$

где τ_L – длительность нахождения красителя в луче лазера. В случае если краситель не движется, уравнение (5) принимает вид, полученный ранее в [8].

На рис. 3 показано влияние длительности облучения на величину сигнала флуоресценции протекающего красителя. Исследования проводились на приборе КЭ “Нанофор 03-С”. В данном эксперименте по капилляру электрофоретически перемещался флуоресцеин, движущийся плоским фронтом. Для

уменьшения диффузии пробы капилляр заполнялся ПДМА-гелем. Скорость красителя менялась пропорционально приложенному напряжению и составляла 0,32, 0,16, 0,032 и 0,0032 мм/с, время облучения при этом увеличивается от 0,08 до 8 с. Чтобы краситель изначально не выгорал, лазер, способный работать в импульсном режиме, был выключен. Включение лазера происходило при вхождении пробы в зону облучения. Интенсивность излучения лазера составляла 10 мВт (2000 Вт/см²), луч фокусировался в диаметр 25 мкм. При данной интенсивности время фотораспада флуоресцеина составило $\tau_d = 0,38$ с. Удвижущегося красителя при включении возбуждения сначала наблюдается максимум сигнала (так как в зоне облучения все молекулы целы), затем быстро начинается фотораспад с последующим выходом флуоресценции на постоянный уровень. Максимуму сигнала пиков на рис. 3 соответствует концентрация c_0 , постоянному уровню – концентрация c . При движении пробы с постоянно включенным лазером высота пика имела бы уровень, соответствующий концентрации c . Величина провала сигнала тем больше, чем меньше скорость движения пробы. Увеличение времени облучения с 0,08 до 8 с ($\tau_L/\tau_d \ll 1$) дает сигнал, составляющий 6% от максимально возможного уровня (последний пик на рис. 3).

Влияние интенсивности возбуждения пробы на отношение сигнал/шум

Интенсивность флуоресценции пропорциональна мощности возбуждения (при отсутствии насыщения возбужденного состояния), следовательно, поток фотонов, испускаемый молекулой красителя с квантовым выходом Q_f с учетом фоторазложения можно записать в виде

$$F = k_a Q_f \frac{1 - \exp(-\tau_L/\tau_d)}{\tau_L/\tau_d}. \quad (6)$$

Анализ ДНК методом КЭ, как правило, характеризуется малым количеством и низкой концентрацией исследуемого вещества, где сигнал флуоресценции зачастую сопоставим с величиной шумов детектирующей системы. В силу сильного рассеивания проходящего через капилляр излучения флуоресценция пробы регистрируется на повышенном уровне фона. По этой причине шумы детектора, вызванные фоновой засветкой, являются преобладающими и их величина изменяется пропорционально квадратному корню из величины фона (т. е. мощности возбуждения). Увеличивая мощность возбуждения, мы увеличиваем интенсивность флуорес-

ценции, но, вместе с этим растут фон и скорость фотораспада красителя, что снижает чувствительность измерений. Поэтому выбор оптимальной мощности возбуждения является важным моментом для достижения максимального отношения сигнал/шум.

Так как фон растет линейно с ростом интенсивности возбуждения, сигнал/шум (S/N) в случае фоновых засветок можно представить в виде отношения

$$S/N = F/\sqrt{P}, \quad (7)$$

где P – мощность лазера (мВт), а изменение $\sqrt{P}$ эквивалентно изменению величины шума. Учитывая, что k_a пропорциональна P , и принимая во внимание (6), S/N можно выразить в следующем виде:

$$\begin{aligned} S/N &= k_a Q_f \frac{1 - \exp(-\tau_L/\tau_d)}{\tau_L/\tau_d} / \sqrt{P} \equiv \\ &\equiv \sqrt{P} \frac{1 - \exp(-\tau_L/\tau_d)}{\tau_L/\tau_d}. \end{aligned} \quad (8)$$

Полученное выражение позволяет оптимизировать мощность лазера для того случая, когда время прохождения молекулы через луч больше времени ее деструкции ($\tau_L \gg \tau_d$). Для оптимизации необходимо сделать следующее:

1) определить время фотодеструкции красителя τ_d при мощности лазера P , которое не приводит к насыщению возбужденного состояния;

2) определить время нахождения молекулы в облучаемой зоне τ_L исходя из максимальной длительности анализа.

Длительность фотораспада определяется непосредственно в капилляре, заполненном гелем. Загруженный в капилляр краситель электрофоретически подводится к зоне облучения. Как только начинает расти пик, лазер выключается и краситель некоторое время движется, не выгорая, после чего электрофорез также прекращается. Вновь включая лазер, наблюдаем экспоненциальную кривую спада флуоресценции. Из этой кривой определяем τ_d , за которое принимаем время, соответствующее уменьшению флуоресценции в e раз.

Так как скорость фотораспада линейно зависит от мощности возбуждения, мы можем аппроксимировать τ_d для различных значений P . Для построения кривой S/N согласно (8) используем флуоресцеин. Возбуждая его ион-аргоновым лазером на мощности 5 мВт, луч которого фокусировался в диаметр 25 мкм, было получено значение τ_d , равное 0,76 с. Линейно пересчитывая значения P и τ_d (т. е. при 5 мВт $\tau_d = 0,76$ с, при 1 мВт $\tau_d = 3,8$ с, при

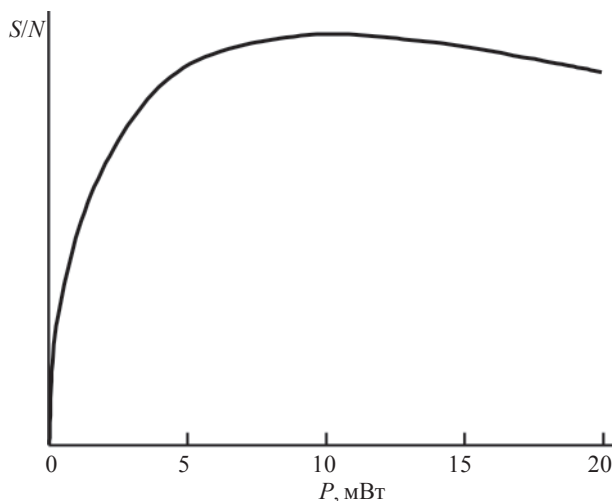


Рис. 4. Кривая для определения оптимальной мощности лазера. Расчет проводился для $\tau_L = 0,47$ с.

2 мВт $\tau_d = 1,9$ с и т. д.), подставляем их для расчета в (8). При длине капилляра 380 мм и длительности перемещения пробы 2 ч, получаем $\tau_L = 0,47$ с. Подставляя τ_d и τ_L в (8) и построив по этим данным кривую отношения S/N , определим оптимальное значение мощности (рис. 4). Из рисунка легко заметить, что оптимальное значение S/N в случае, когда проба движется по капилляру около 2 ч и ширина облучаемой зоны составляет 25 мкм, достигается при мощности лазера около 10 мВт. Практические исследования отношения S/N при разных интенсивностях лазера подтвердили правильность подхода, позволяющего определить оптимальную мощность возбуждающего излучения.

Экспериментально влияние интенсивности возбуждения на отношение S/N при электрофоретическом движении красителя в капилляре продемонстрировано на рис. 5. Флуоресцеин с концентрацией 10^{-10} М запускался по капилляру электрофоретичес-

ки, что обеспечивало практически прямоугольный профиль пика. Интенсивность лазера составляла 2, 10 и 40 мВт. При скорости движения 0,054 мм/с время облучения составляет 0,47 с. Видно, что при увеличении мощности облучения с 2 до 10 мВт наблюдается рост чувствительности в 1,5 раза при росте фона в 5 раз. При увеличении мощности с 10 до 40 мВт вследствие фотораспада и роста шумов детектора наблюдается уже падение чувствительности примерно в 1,5 раза при 4-кратном увеличении фона. Шумы в этих измерениях возрастали пропорционально квадратному корню из увеличения фона. Результаты на рис. 5 хорошо согласуются с выражением (8). Пик на среднем графике с наибольшим отношением S/N укладывается в оптимальное значение мощности лазера в области 10 мВт, приведенное на рис. 4. Таким образом, выражение (8) и построенный по нему график (рис. 4) позволяют выбрать оптимальную мощность лазера и добиться максимального отношения S/N при различных скоростях движения пробы в капиллярном электрофорезе.

Выводы

Исследован процесс фотораспада флуоресцеина в проточной системе. Разработана методика, позволяющая определить оптимальную мощность возбуждающего излучения лазера для случая, когда фотораспад пробы, движущейся в аналитической системе, приводит к значительному снижению полезного сигнала. Методика может быть использована для оптимизации условий флуоресцентного детектирования ДНК, в хроматографическом анализе и проточной цитофлуориметрии. Также определение оптимальной мощности лазера может быть полезно при проектировании высокочувствитель-

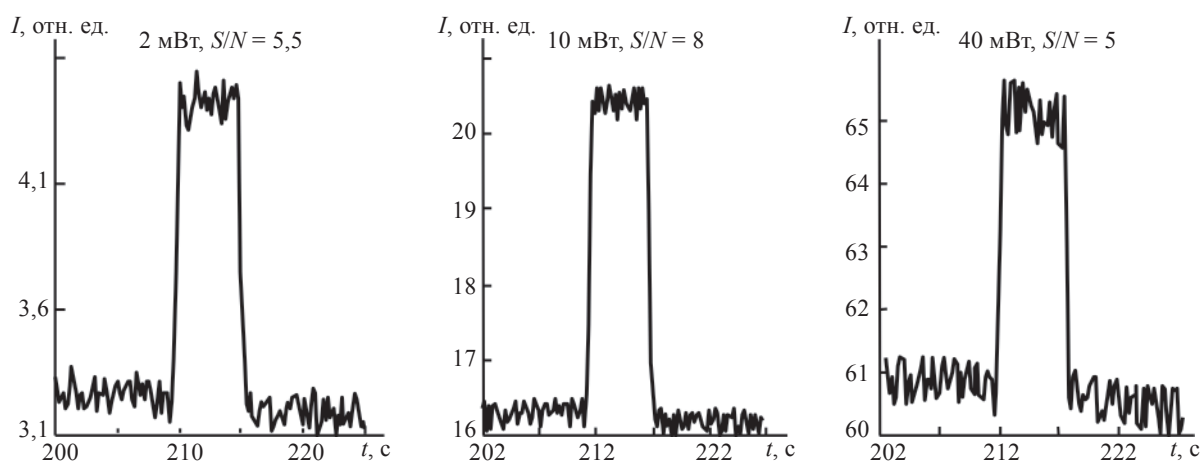


Рис. 5. Сигнал флуоресцеина при электрофоретическом движении в капилляре. Мощность возбуждающего лазера 2, 10 и 40 мВт. Скорость пробы 0,054 мм/с ($\tau_L = 0,47$ с).

ных флуоресцентных детекторов, позволяя выбрать источник возбуждения без избыточной мощности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kusterbeck A.W., Wemhoff G.A., Charles P.T., Yeager D.A., Bredehorst R., Vogel C.W., Ligler F.S. A continuous-flow immunoassay for rapid and sensitive detection of small molecules // *J. Immunol. Med.* 1990. V. 135. P. 191–197.
 2. Zarrin F., Dovichi N.J. Sub-picoliter detection with the sheath flow cuvette // *Anal. Chem.* 1985. V. 57. P. 2690–2692.
 3. Zander C., Drexhage K.H. Sequential counting of single molecules in a microcapillary // *Proc. Soc. Photo-opt. Ins.* 1997. V. 2980. P. 545–550.
 4. Hirschfeld T., Baton D. Antigen Detecting Reagents // *Applications for Letters Patent.* 1974.
 5. Nguyen D.C., Keller R.A., Trkula M. Ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in hydrodynamically focused flows // *JOSA. B.* 1987. V. 4. P. 138–143.
 6. Lee Y.H., Maus R.G., Smith B.W., Winevordner J.D. Laser-Induced Fluorescence Detection of a Single Molecule in a Capillary // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 4142–4149.
 7. Паркер С.А. Фотолюминесценция растворов. М.: Мир, 1972. 512 с.
 8. Hirschfeld T. Quantum efficiency independence of the time integrated emission from a fluorescent molecule // *Appl. Opt.* 1976. V. 15. P. 3135–3139.
-