

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА общей физики

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
«СОЗДАНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО СПЕКТРОМЕТРА И  
ОТРАБОТКА МЕТОДИК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛОЖНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ  
СИСТЕМ»

Выполнил студент  
205м группы:  
Савостьянов Александр Олегович

---

подпись студента

Научные руководители:  
д.ф. -м.н., Салецкий А.М.

---

подпись научного руководителя

к.ф.-м.н., Баранов А.Н.

---

подпись научного руководителя

Допущена к защите 26.05.2015

Зав.кафедрой \_\_\_\_\_

подпись зав.кафедрой

Москва

2017

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	7
1.1 Теоретические основы ФКС.....	7
1.1.1 Автокорреляционный анализ.....	7
1.1.2 Кросс-корреляционный анализ.....	14
1.2 Экспериментальная реализация метода ФКС.....	16
1.2.1 Оптические системы для возбуждения люминесценции.....	17
1.2.2 Приемники оптического излучения и корреляторы.....	19
1.2.3 Оптические системы для сбора сигнала.....	20
1.2.4 Альтернативные схемы для ФКС.....	23
ГЛАВА 2. ОПИСАНИЕ СОЗДАННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ.....	25
2.1 Лазер.....	27
2.2 Объективы.....	29
2.2.1 Расчет параметров фокальной области для используемых объективов.....	31
2.3 Конфокальная диафрагма .....	33
2.4 Фильтры .....	34
2.5 ФЭУ.....	36
2.6 Коррелятор .....	38
ГЛАВА 3. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	42
ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	46
4.1 Сравнительный анализ фильтров различных типов .....	46
4.2 Определение отношения сигнал/шум для различных концентраций красителя .....	47
4.3 Измеренные автокорреляционные функции .....	49

4.4 Анализ полученных результатов .....	53
---	----

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

## ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС) — современная экспериментальная методика, позволяющая изучать и эффективно анализировать динамические свойства молекул, макромолекул и наночастиц в различных средах. В отличие от традиционных методов флуоресцентной спектроскопии, ФКС в общем случае исследует не спектральное распределение интенсивности излучения, а флуктуации интенсивности излучения, регистрируемого от небольшого числа интенсивно светящихся люминофоров, находящихся в равновесных диффузных системах. Главные причины таких флуктуаций — диффузия флуоресцирующих объектов через исследуемый объем, либо изменение детектируемого сигнала во времени вследствие протекания химических реакций [1].

Метод ФКС позволяет осуществлять количественный анализ таких флуктуаций с помощью вычисления автокорреляционной функции вида:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \rangle * \langle \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

где за  $F(t)$  принимается интенсивность регистрируемого излучения,  $\tau$  — временной промежуток, разделяющий два измеренных сигнала. Строгое описание метода впервые было дано Д.Магде, Л. Элсоном и В.В. Веббом в 1972г. [2]. Позднее ими же был предложен способ практической реализации, эффективность которого подтвердили эксперименты по наблюдению за флуктуациями химического равновесия в реакциях связывания бромистого этидия с двухцепочечной молекулой ДНК. Так же предсказаны широкие перспективы метода для исследования релаксационных процессов [3]. В последующие годы было опубликовано немалое количество работ, посвященных определению концентраций,

коэффициентов трансляционной и вращательной диффузии различных молекул [4]. Эти ранние исследования страдали, главным образом, от невысокого отношения сигнал-шум, вызванного большим числом детектируемых молекул, значительным уровнем фоновой засветки, недостаточной чувствительностью используемых детекторов.

Настоящий же расцвет метода ФКС наступил в начале 1990-х годов, когда была предложена и осуществлена идея о применении конфокального микроскопа для детектирования одиночных молекул [5,6].

На протяжении последних 20 лет ФКС активно используется для исследования процессов поступательной и вращательной диффузии одиночных молекул в растворах и коллоидах, определения их размеров, концентраций, молекулярных масс, констант химических реакций, а так же для изучения межмолекулярных взаимодействий и процессов образования молекулярных агрегатов [4]. На сегодняшний день, флуоресцентная корреляционная спектроскопия находит свое обширное применение в биофизике, где наряду с исследованиями флуоресцирующих объектов (например, зеленый флуоресцентный белок [7]), активно применяются одиночные люминофоры, используемые в качестве флуоресцентных маркеров и позволяющие с высокой точностью определять положение в пространстве и перемещение биологических объектов. Детектирование антител, наблюдение за процессами, сопровождающими проникновение вирусов в живые клетки, исследование процессов, происходящих в ядрах и мембранах живых клеток, изучение флуктуаций в конформации белков — решение этих задач активно задействует методы ФКС.

Помимо всего вышеперечисленного, ФКС применяется и для исследования фотодинамических свойств самих люминофоров, например кинетики триплетных состояний в органических красителях и флуоресцентных белках, явления антигруппировки фотонов, процессов фототушения люминесценции [8].

Рисунок 1 наглядно демонстрирует наличие стабильного интереса исследователей к применению данного экспериментального метода.

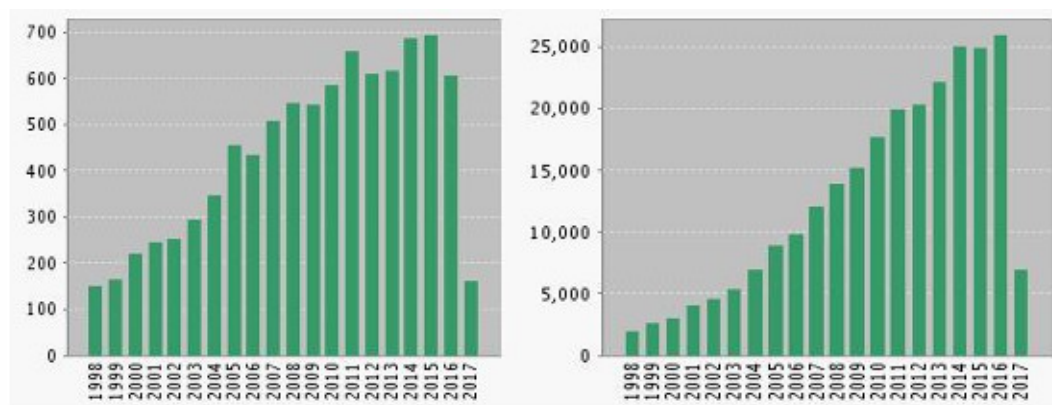


Рисунок 1. Количество публикаций (слева) и цитирований (справа) по запросу "Fluorescence correlation spectroscopy". По данным Web of science.

Все вышесказанное определяет актуальность данной магистерской диссертации.

Для выполнения диссертации были поставлены следующие цели и задачи:

- 1) Создание корреляционного спектрометра, включающее в себя подбор оптических компонентов, их юстировку, теоретический анализ эффективности их потенциального применения в исследованиях, связанных с ФКС
- 2) Отработка методик по измерению люминесценции от сверхмалых концентраций исследуемого вещества
- 3) Оценка эффективности работы установки с помощью вычисления автокорреляционных функций для калибровочного образца с заранее известным коэффициентом диффузии (Родамин 6Ж)
- 4) В случае соответствия полученных экспериментальных данных с данными известными из литературы
- 5) Разработка рекомендаций для дальнейшего совершенствования экспериментальной установки.

# ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Теоретические основы ФКС

### 1.1.1 Автокорреляционный анализ

В флуоресцентной корреляционной спектроскопии измеряется интенсивность излучения  $F(t)$ , детектируемая от небольшого числа молекул, находящихся в исследуемом объеме в состоянии термодинамического равновесия (рисунок 2) [4].

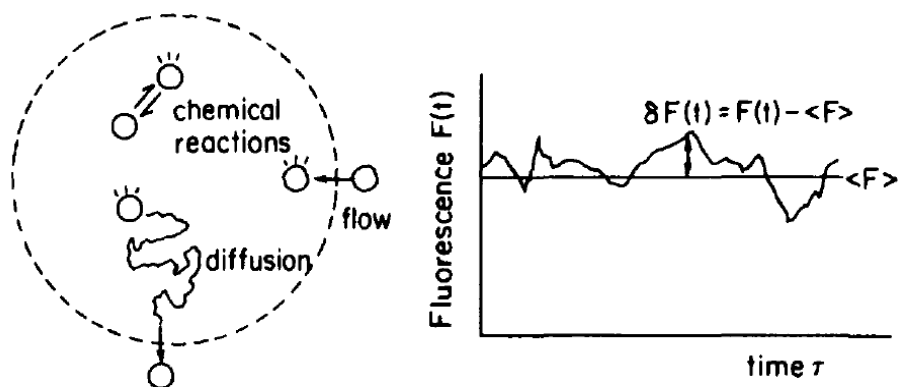


Рисунок 2. Основные причины флуктуации интенсивности измеряемого сигнала от небольшого числа флуоресцирующих молекул.

Если бы сигнал не менялся во времени, можно было бы считать, что  $F(t) = \langle F \rangle = const$ . Однако изменение числа частиц в исследуемом объеме вследствие броуновского движения, либо наличие химических реакций приводит в отклонению величины детектируемого сигнала от величины среднего значения:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle \quad (1.1)$$

$$\text{где } \langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad (1.2)$$

Если флуктуации вызваны изменением концентрации  $\delta C$ , то  $\delta F(t)$  можно представить в виде [9]:

$$\delta F(t) = k \int_V I_{ex}(\vec{r}) S(\vec{r}) \delta(\sigma q C(\vec{r}, t)) dV \quad (1.3)$$

где  $k$  – эффективность регистрируемого излучения, определяемая величиной квантового выхода люминофоров и чувствительностью детектора

$I_{ex}(\vec{r})$  – пространственное распределение интенсивности

лазерного излучения, используемого для возбуждения

люминесценции в исследуемых образцах, с амплитудой  $I_0$

$S(\vec{r})$  – функция, определяющая пространственную эффективность

детектирования сигнала, определяемую параметрами связки

объектив-диафрагма в конфокальной схеме регистрации

$\delta(\sigma q C(\vec{r}, t))$  – функция, определяющая динамику одиночного

люминофора, где  $\delta\sigma$  – флуктуации эффективного сечения поглощения

одиночной молекулы,  $\delta q$  – флуктуации значения величины квантового

выхода,  $\delta C(\vec{r}, t)$  – изменения концентрации молекул

в исследуемом объеме.

Определение всех вышеперечисленных параметров весьма затруднительно, а в отдельных случаях и вовсе невозможно. Для упрощения уравнения (1.3)

вводится функция  $W(\vec{r}) \equiv \frac{I_{ex}(\vec{r})}{I_0} S(\vec{r})$ , описывающая пространственное

распределение излучения. Если для возбуждения используется

сфокусированный лазерный луч, обладающий хорошим гауссовым

профилем, а люминесценция собирается с помощью конфокальной

точечной диафрагмы, то такую функцию можно аппроксимировать

трехмерной функцией Гаусса, зависящей от пространственных координат  $x$ ,



у и z и имеющей вид:

$$W(\vec{r}) = e^{-2 \frac{x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-2 \frac{z^2}{z_0^2}} \quad (1.4)$$

где  $r_0$  и  $z_0$  - радиальные и аксиальные размеры объема, соответствующие уменьшению значения гауссовой функции до величины, составляющей  $\frac{1}{e^2}$  от ее максимального значения.

Также вводится параметр  $\eta_0 = I_0 k \sigma q$ , определяющий количество зарегистрированных фотонов, испускаемых одной молекулой за секунду и характеризующий отношение сигнал-шум системы.

Таким образом, равенство (1.3) принимает вид:

$$\delta F(t) = \int_V W(\vec{r}) \delta(\eta C(\vec{r}, t)) dV \quad (1.5)$$

Нормированная автокорреляционная функция, как было отмечено выше, имеет вид:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \rangle * \langle \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1.6)$$

Подстановка (1.5) в (1.6) приводит к следующему результату:

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(\vec{r}) W(\vec{r}') \langle \delta(\eta C(\vec{r}, t)) \delta(\eta C(\vec{r}', t+\tau)) \rangle dV dV'}{\left( \int W(\vec{r}) \langle \delta(\eta C(\vec{r}, t)) \rangle dV \right)^2} \quad (1.7)$$

$$\text{где } \delta(\eta C(\vec{r}, t)) = C \delta \eta + \eta \delta C \quad (1.8)$$

Если принять , что за время измерения флуоресцентные свойства молекул остаются постоянными, т. е.  $\delta \eta = 0$  , то выражение (1.7) может быть значительно упрощено:

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(\vec{r}) W(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \int W(\vec{r}) dV)^2} \quad (1.9)$$

Рассматривая только молекулы , способные диффундировать во всех трех направлениях, автокорреляционный член  $\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle$  может быть вычислен и записан следующим образом [9]:

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{(\vec{r}-\vec{r}')^2}{4D\tau}} \quad (1.10)$$

тогда:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \frac{\int \int W(\vec{r}) W(\vec{r}') e^{-\frac{(\vec{r}-\vec{r}')^2}{4D\tau}} dV dV'}{(\int W(\vec{r}) dV)^2} \quad (1.11)$$

Время диффузии  $\tau_D$  - среднее значение времени, за которое люминофор диффундирует через радиальную часть исследуемого объема (двухмерная диффузия):

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (1.12)$$

Для случая трехмерной диффузии характерное время будет в полтора раза

меньше [1] и составит  $\frac{r_0^2}{6D}$ .

В современной экспериментальной реализации метода ФКС (подробней об этом в следующем пункте Главы 1), использующей схему регистрации люминесценции, исследуемый объем определяется размером сфокусированного на образце лазерного пятна и, таким образом, фактически равен объему фокальной области. Такой объем можно определить через функцию  $W(\vec{r})$  следующим образом [9]:

$$V_{\text{фокал}} = \frac{(\int W(\vec{r}) dV)^2}{\int W^2(\vec{r}) dV} \quad (1.13)$$

С учетом выражения (1.4) после интегрирования по всему пространству получается, что:

$$V_{\text{фокал}} = \pi^2 r_0^2 z_0 \quad (1.14)$$

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{фокал}} \langle C \rangle} \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_D})} \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{r_0}{z_0})^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (1.15)$$

При двумерной диффузии уравнение (1.15) упрощается до вида:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{фокал}} \langle C \rangle} \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_D})} \quad (1.15^*)$$

Очевидно, что автокорреляционная функция  $G(\tau)$  является монотонно убывающей и ее максимальное значение  $G(0)$ , называемое амплитудой

равно:

$$G(0) = \frac{1}{V_{\text{фокал}} \langle C \rangle} = \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (1.16)$$

Таким образом, равенство (1.16) устанавливает однозначную связь между концентрацией исследуемого вещества, величиной фокального объема и амплитудой автокорреляционной функции. Таким образом, концентрацию и коэффициент диффузии флуоресцентных частиц возможно оценить с помощью уравнений (1.15), (1.15\*) и (19) из измерения  $G(\tau)$ , при условии, если фокальный объем исследован в отдельном эксперименте.

В приведенных выше рассуждениях считалось, что величина детектируемого сигнала определяется только движением флуоресцирующих частиц через область перетяжки, образованной сфокусированным лазерным лучом (условие  $\delta\eta = 0$ ). В действительности для реальных красителей и значительных мощностей возбуждения возможно наблюдение явления «мерцания» люминесценции, вызванное безызлучательным переходом молекул в первое возбужденное триплетное состояние и достаточно долгим нахождением в нем (рисунок 3) [9,10].

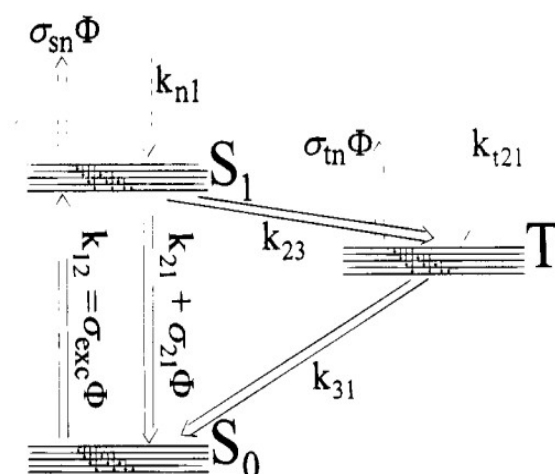


Рисунок 3. Схема энергетических уровней молекулы органического красителя Родамин 6Ж. Взято из [10].

Тем не менее, характерные времена синглет-триплетных переходов все же гораздо меньше характерных времен диффузии [10], следовательно при расчете корреляционной функции необходимо ввести дополнительный множитель [11]:

$$G_{\text{сумм}}(\tau) = G(\tau) X(\tau) \quad (1.17)$$

Изменения интенсивности люминесценции, вызванные переходами в триплетные состояния описываются достаточно простыми экспоненциальными функциями [11]:

$$X_{\text{триплет}}(\tau) = 1 - T + T e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{триплет}}}} \quad (1.18)$$

Выражение (1.18), может быть обобщено для любых достаточно быстрых фотофизических процессов, которые сопровождаются переходами молекулы из излучающего в неизлучающее состояние.

Выражение же для автокорреляционной функции, связанной с перемещением молекул в общем виде для  $n$  частиц можно записать следующим образом:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{фокал}}} \frac{\sum_{i=1}^n \eta_i \langle C_i \rangle M_i(\tau)}{\left( \sum_{i=1}^n \eta_i \langle C_i \rangle \right)^2} \quad (1.19)$$

где  $M_i(\tau)$  для случаев дву- и трехмерной диффузии выглядит в соответствии с (1.15\*) и (1.15) (получается путем деления (1.15) и (1.15\*)

на амплитуду  $G(0) = \frac{1}{V_{\text{фокал}} \langle C \rangle}$ ).

### 1.1.2 Кросс-корреляционный анализ

Если в автокорреляционном анализе измеренный сигнал сравнивается непосредственно с самим собой спустя некоторый временной промежуток, то метод кросс-корреляции подразумевает сравнение сигналов, полученных с двух разных детекторов. Такой подход позволяет исключить из конечных результатов нежелательные артефакты фотоприемников [9].

Частным случаем кросс-корреляционной спектроскопии является двухцветная флуоресцентная спектроскопия, в которой для возбуждения двух разных типов молекул (как правило используемых в качестве флуоресцентных маркеров, помечающих нефлуоресцирующие макромолекулы и сложные биологические объекты) используются два отдельных лазера. Данный метод продемонстрировал чрезвычайную эффективность в исследованиях межмолекулярных взаимодействий [16].

Математический формализм, описывающий кросс-корреляционный анализ аналогичен такому для автокорреляции. Равенство (1.3), обобщенное на случай двух детекторов, принимает вид системы двух уравнений:

$$\begin{cases} \delta F_1(t) = \int W_1(\vec{r}) \eta_1 \delta(C_1(\vec{r}, t) + C_{12}(\vec{r}, t)) dV \\ \delta F_2(t) = \int W_2(\vec{r}) \eta_2 \delta(C_2(\vec{r}, t) + C_{12}(\vec{r}, t)) dV \end{cases} \quad (1.20)$$

где  $W_i(\vec{r})$  – пространственное распределение интенсивности

люминесценции для маркеров двух видов ( $i = 1, 2$ )

$C_i(\vec{r}, t)$  – концентрация объектов, меченных маркерами двух разных видов ( $i = 1, 2$ )

$C_{12}(\vec{r}, t)$  – концентрация объектов, меченных маркерами обоих типов

Считая, что движение различных объектов описывается  $M_i(\tau)$  (аналогично (1.19)), а оба канала детектирования имеют одинаковое распределение  $W_i(\vec{r})$  и, следовательно, одинаковый  $V_{focal}$ , корреляционные функции приобретают следующий вид [21]:

$$G_{автокорр,i}(\tau) = \frac{(\langle C_i \rangle M_i(\tau) + \langle C_{12} \rangle M_{12}(\tau))}{V_{фокал} (\langle C_i \rangle \langle C_{12} \rangle)^2} \quad i = 1, 2 \quad (1.21)$$

$$G_{кросскорр}(\tau) = \frac{\langle C \rangle M_{12}(\tau)}{V_{фокал} (\langle C_1 \rangle + \langle C_{12} \rangle) (\langle C_2 \rangle + \langle C_{12} \rangle)} \quad (1.22)$$

Тогда средняя концентрация объектов, помеченных маркерами разного типа:

$$\langle C_{12} \rangle = \frac{G_{кросскорр}(0)}{G_{автокорр,1}(0) G_{автокорр,2}(0) V_{фокал}} \quad (1.23)$$

## 1.2 Экспериментальная реализация метода ФКС

Современная экспериментальная реализация метода ФКС подразумевает возбуждение люминесценции от очень малого числа частиц, возбуждаемых сфокусированным лазерным лучом. Оптическую установку для ФКС можно условно представить состоящей из трех основных компонентов: оптической системы для возбуждения люминесценции, оптической системы для сбора испущенных люминофорами фотонов, а также детекторов сигнала и устройств для его последующего анализа — корреляторов. Схема типичной экспериментальной установки для ФКС,

использующей систему конфокальной фильтрации сигнала, представлена на рисунке 4 [14]:

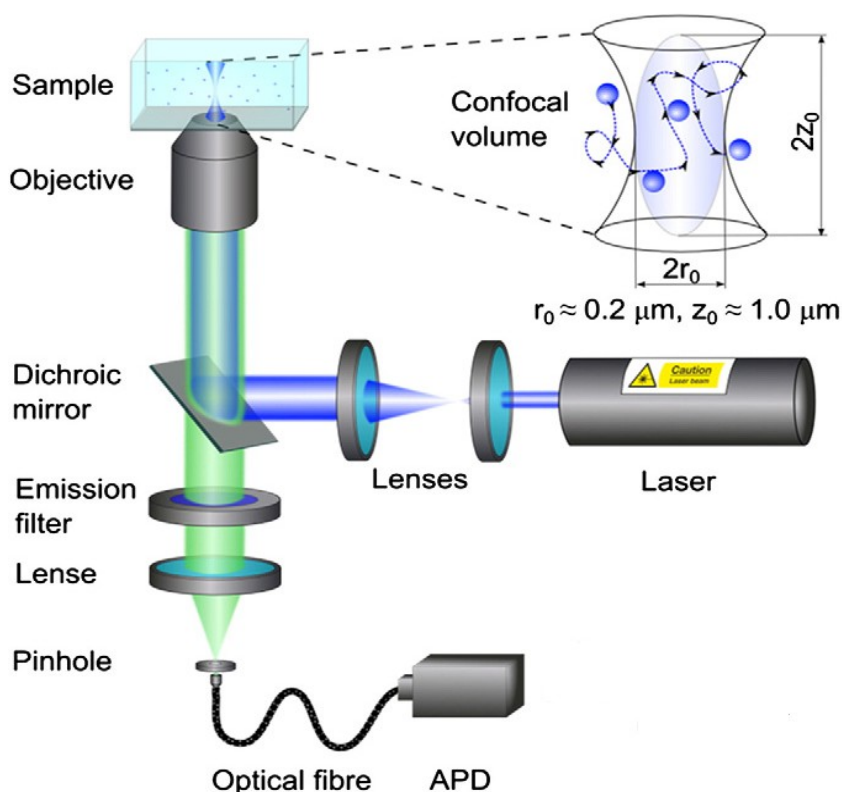


Рисунок 4. Типичная экспериментальная установка для ФКС. Взято из [14].

Лазерный луч, длина волны которого соответствует полосе поглощения исследуемого люминофора, фокусируется с помощью микрообъектива в некоторой точке исследуемого образца, предварительно проходя через расширитель пучка и достигая в диаметре размера входного зрачка микрообъектива. Флуоресценция от образца собирается тем же микрообъективом, после чего фокусируется с помощью собирающей линзы на конфокальной диафрагме, затем уже только попадая в детектор. Параметры дихроичного зеркала подобраны таким образом, чтобы эффективно отражать лазерное излучение и свободно пропускать



люминесценцию. Дополнительные фильтры служат для отрезания рассеянного лазерного света.

Экспериментальная установка для двухцветной кросс-корреляционной спектроскопии включает в себя два отдельных лазера для двух разных типов молекул, содержащих флуоресцирующие маркеры различных цветов, и два независимых детектора для измерения люминесценции на разных длинах волн (маркеры подбираются таким образом, чтобы наблюдаемая люминесценция была разных цветов, например, красная и зеленая). Пример такой установки представлен на рисунке 5 [18]:

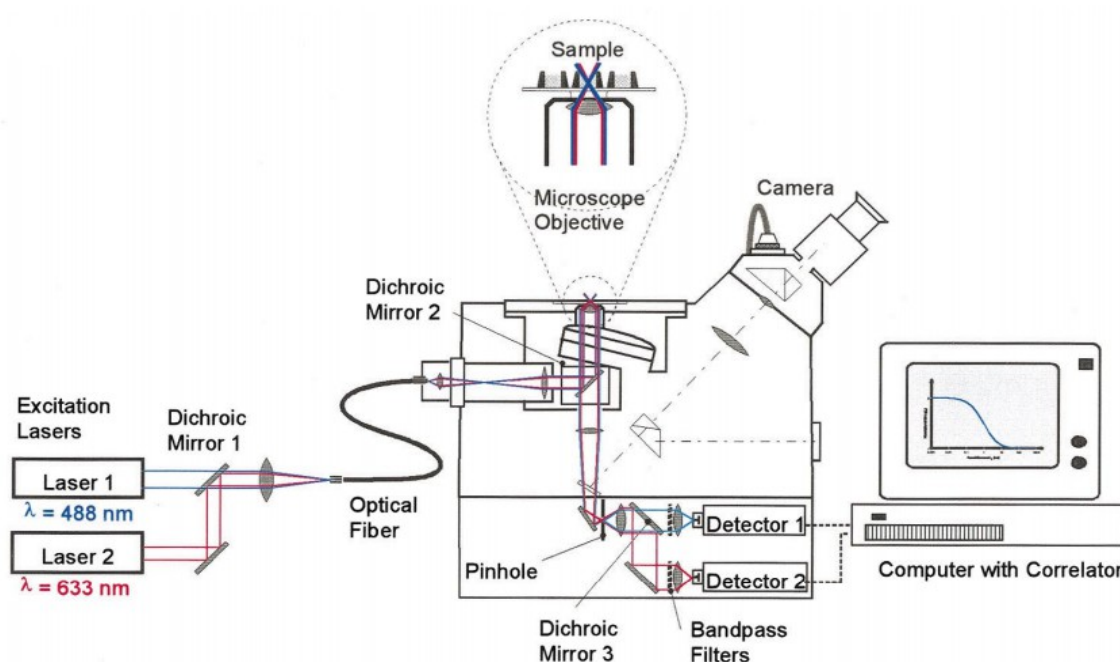


Рисунок 5. Экспериментальная установка для двухцветной кросс-корреляционной спектроскопии. Взято из [18].

### 1.2.1 Оптические системы для возбуждения люминесценции

Наибольшее распространение в исследованиях, связанных с ФКС, изначально получили аргоновые, аргон-криптоновые и гелий-неоновые

лазеры [8], спектральные линии которых подходят для большинства существующих органических красителей. В последнее время достаточно распространено и применение диодных лазеров, способных работать в одномодовом режиме и обеспечивать стабильную мощность излучения.

Из теории дифракции известно, что размер фокального пятна для параллельного пучка света, сфокусированного идеальной линзой в направлении, перпендикулярном оптической оси, определяется следующим выражением [12]:

$$r'_0 \approx 1,22 \frac{\lambda}{D} f \quad (1.24)$$

где  $\lambda$  – длина волны,  $D$  – диаметр пучка,  $f$  – фокусное расстояние линзы. Так как диаметр пучка используемых в спектроскопии лазеров, как правило, не превышает 2 - 3 мм, то для уменьшения фокального объема используют расширители пучка, представляющие собой систему из двух, трех и более линз. Возможно и использование в расширителях пучка микрообъективов с коррекцией аберраций, что положительно сказывается на качестве получаемого на выходе луча.

Типичная мощность лазерного излучения для экспериментов, цель которых состоит в изучении процессов диффузии, не превышает десятков мкВт [8]. При больших интенсивностях наблюдается насыщение молекул в центре фокального объема, а следовательно возрастание паразитного свечения от молекул из-за его пределов. Кроме того, уже при росте мощности излучения до величин в десятые доли мВт наблюдается стремительное возрастание вероятности перехода молекулы красителя в триплетное состояние [13]. Для дополнительного ослабления лазерных пучков применяются нейтральные светофильтры.

Несмотря на то, что наибольшими значениями числовой апертуры ( $NA \sim$

1.2 – 1.4) обладают объективы с масляной иммерсией, их фокальная плоскость располагается непосредственно на поверхности покровного стекла [8], и попытка сфокусировать лазерный луч даже на глубине в несколько мкм внутри образца приводит к значительному падению качества получаемой перетяжки и возникновению оптических aberrаций. Эта проблема устраняется использованием микрообъективов с водяной иммерсией ( $NA \sim 0.9 - 1.2$ ), прекрасно подходящих для работы с образцами, растворенными в дистиллированной воде.

### 1.2.2 Приемники оптического излучения и корреляторы

Вплоть до последнего времени в экспериментах по измерению автокорреляционных функций люминесценции использовались одноканальные фотоприемники: фотоэлектронные умножители (ФЭУ) (квантовая эффективность  $\sim 20 - 30\%$ ) [8] и лавинные фотодиоды (квантовая эффективность до  $50 - 70\%$ ). К их недостатками можно отнести наличие послеимпульсов, строго коррелированных с основными импульсами и отстающих от них на времена от десятков нано- до десятков микросекунд. Кроме того, при работе с ФЭУ необходимо учитывать различия в их спектральной чувствительности на различных длинах волн.

Потребность в постоянном росте точности измерений привела к использованию новых типов детекторов: однофотонных лавинных диодов (SPAD), многоканальных чувствительных КМОП-камер (sCMOS), а так же ПЗС-камер (EMCCD), рассчитанных на регистрацию одиночных фотонов и демонстрирующих впечатляющую квантовую эффективность, достигающую 95%. (Подробный обзор современных детекторов для ФКС приведен в работе [15]).

Для вычисления корреляционных функций в режиме реального времени

применяются специализированные компьютерные платы — корреляторы. Большинство современных корреляторов при построении корреляционных функций используют логарифмическую шкалу времени. Время выборки, как правило, не превышает десятков наносекунд (В отдельных случаях временное разрешение может достигать нескольких нс — зависит от свойств фотоприемника).

### 1.2.3 Оптические системы для сбора сигнала

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия является, по сути, разновидностью спектроскопии одиночных молекул (СОМ). Регистрация фотонов, испускаемых небольшим количеством люминофоров затруднена, главным образом, наличием значительного количества паразитного излучения, попадающего на чувствительный слой фотоприемника. В ФКС, в отличие от СОМ, в общем случае не применяются спектральные приборы (если не относить к ним интерференционные фильтры), что вносит дополнительные трудности в интерпретацию измеренного сигнала.

На сегодняшний день существуют несколько способов избавления от паразитной засветки и получения высокого соотношения сигнал-шум. Основная часть этих способов так или иначе связана с использованием конфокальной селекции сигнала.

Попытка применения в 1993 г. Риглером и его коллегами конфокальной диафрагмы [6] оказалась настолько успешной, что экспериментальные установки для ФКС на базе конфокального микроскопа и на сегодняшний день используются в подавляющем числе исследований.

Принципиальная схема конфокальной фильтрации сигнала представлена на рисунке 6 [19]. Лазерный луч наводится на исследуемый образец с помощью селективного дихроичного зеркала (СЗ на рисунке 6). Многослойное диэлектрическое покрытие такого зеркала эффективно

отражает падающее на него лазерное излучение и пропускает люминесценцию с минимальными потерями на отражение. Фокусировка лазера на образце осуществляется с помощью светосильного микрообъектива с высоким значением числовой апертуры. Флуоресценция собирается тем же объективом и после прохождения через дихроичное зеркало фокусируется с помощью собирающей линзы (Л) (либо микрообъектива) на малой диафрагме (КД), размещенной в фокальной плоскости линзы. Через диафрагму проходит только та флуоресценция, которая излучается из небольшого объема вблизи фокуса лазерного луча (рисунок 6а). Флуоресценция, испускаемая молекулами, находящимися за пределами фокального объема (рисунок 6б,в) оказывается дефокусированной в плоскости диафрагмы. Правильный подбор размера диафрагмы позволяет значительно уменьшить уровень фоновой засветки, вызванной излучением люминофоров, находящихся за пределами фокальной перетяжки. Диаметр типичной диафрагмы составляет 30-50 мкм, однако в зависимости от применяемых объективов он может значительно изменяться как в меньшую, так и в большую сторону [8].

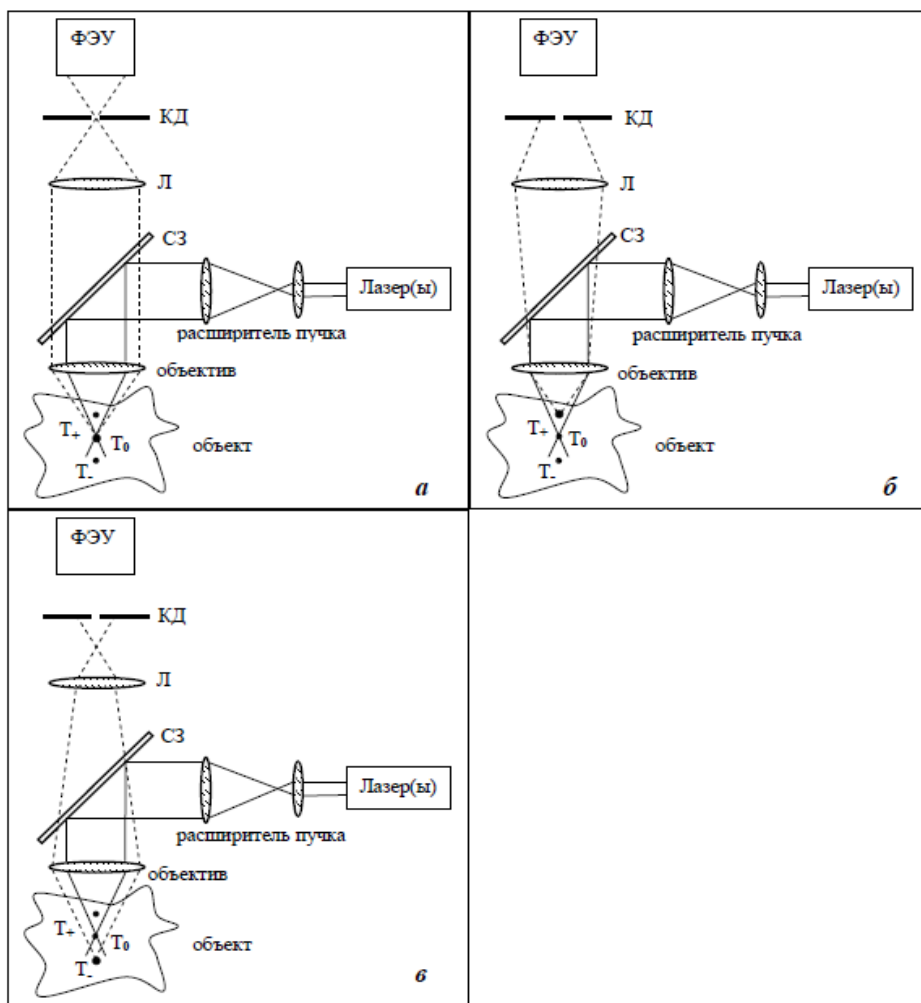


Рисунок 6. Принцип конфокальной селекции сигнала. Взято из [19].

Помимо селективных дихроичных зеркал для отсеивания паразитного излучения используются и дополнительные системы. Как правило, это интерференционные полосовые, либо длинноволновые фильтры. Как показано в работе [20], правильный выбор фильтров может привести к значительному увеличению отношения сигнал-шум.

#### 1.2.4 Альтернативные схемы ФКС

##### 1) SPIM – микроскопы

Современной альтернативой классическим конфокальным микроскопам служат микроскопы типа SPIM (single plane illumination microscope) [25,26]. В микроскопах такого типа фокусировка лазерного луча с помощью цилиндрической линзы и коллимация флуоресценции осуществляются во взаимно-перпендикулярных плоскостях (рисунок 7 [15]), что приближает пространственное разрешение вплотную к теоретически возможному и естественным образом решает проблему попадания в фотоприемник лазерного излучения.

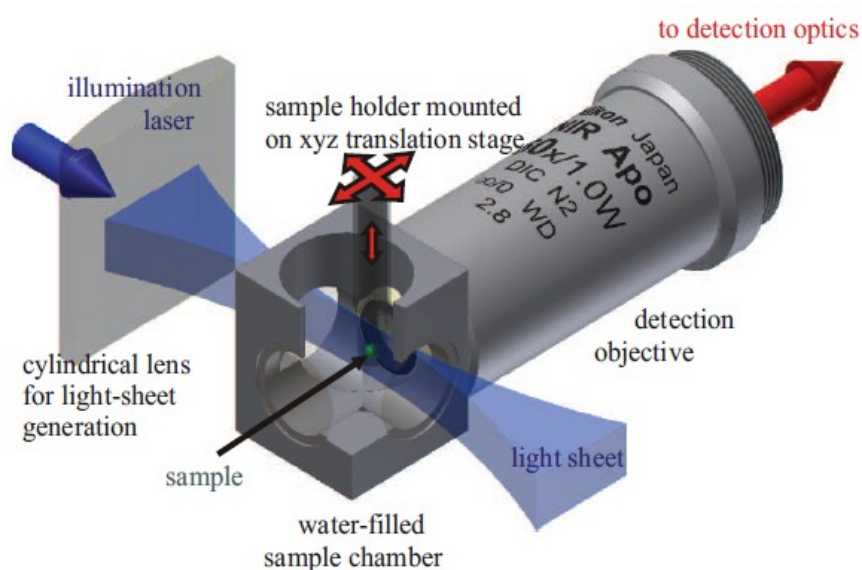


Рисунок 7. Возбуждение и сбор люминесценции в микроскопах типа SPIM. Взято из [15].

## 2) Сканирующая ФКС

Стандартные методы ФКС являются малочувствительными по отношению к неподвижным или медленно движущимся молекулярным агрегатам, например, белковым кластерам в клеточных мембранах [21]. В таких случаях может применяться либо сканирование образца лазерным лучом, либо перемещение образца относительно луча. Измеренная комбинированная автокорреляционная функция является периодической с несколькими пиками, разделенными периодом сканирования [22]. Анализируя такую функцию, можно вычислить коэффициенты диффузии и

концентрации молекул, как и для случая классической автокорреляционной функции.

### 3) Стробируемая ФКС

При определенных условиях эксперимента (например при измерении «*in vivo*») наличие высокой фоновой засветки неизбежно. В такой ситуации разные люминофоры можно отличать по различным временам жизни возбужденного состояния. Используя импульсное возбуждение и селективное исключение фотонов, классифицируемых по временной задержке между актом поглощения света и флуоресценцией, можно значительно облегчить анализ концентрации и времен диффузии различных люминофоров [23].

### 4) Экспериментальные схемы с использованием полного внутреннего отражения

В ранних работах [24], посвященных экспериментальной реализации ФКС, предлагалось использовать явление полного внутреннего отражения для возбуждения люминесценции в тонком слое исследуемого раствора (рисунок 8 [4]).

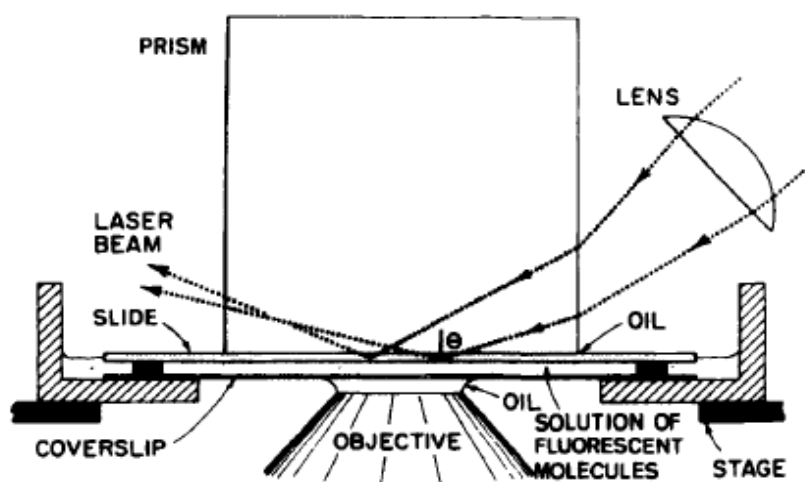


Рисунок 8. Использование явления полного внутреннего отражения в установке для ФКС. Взято из [4].



## ГЛАВА 2. ОПИСАНИЕ СОЗДАННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ

Схема созданной в рамках данной работы экспериментальной установки представлена на рисунке 9:

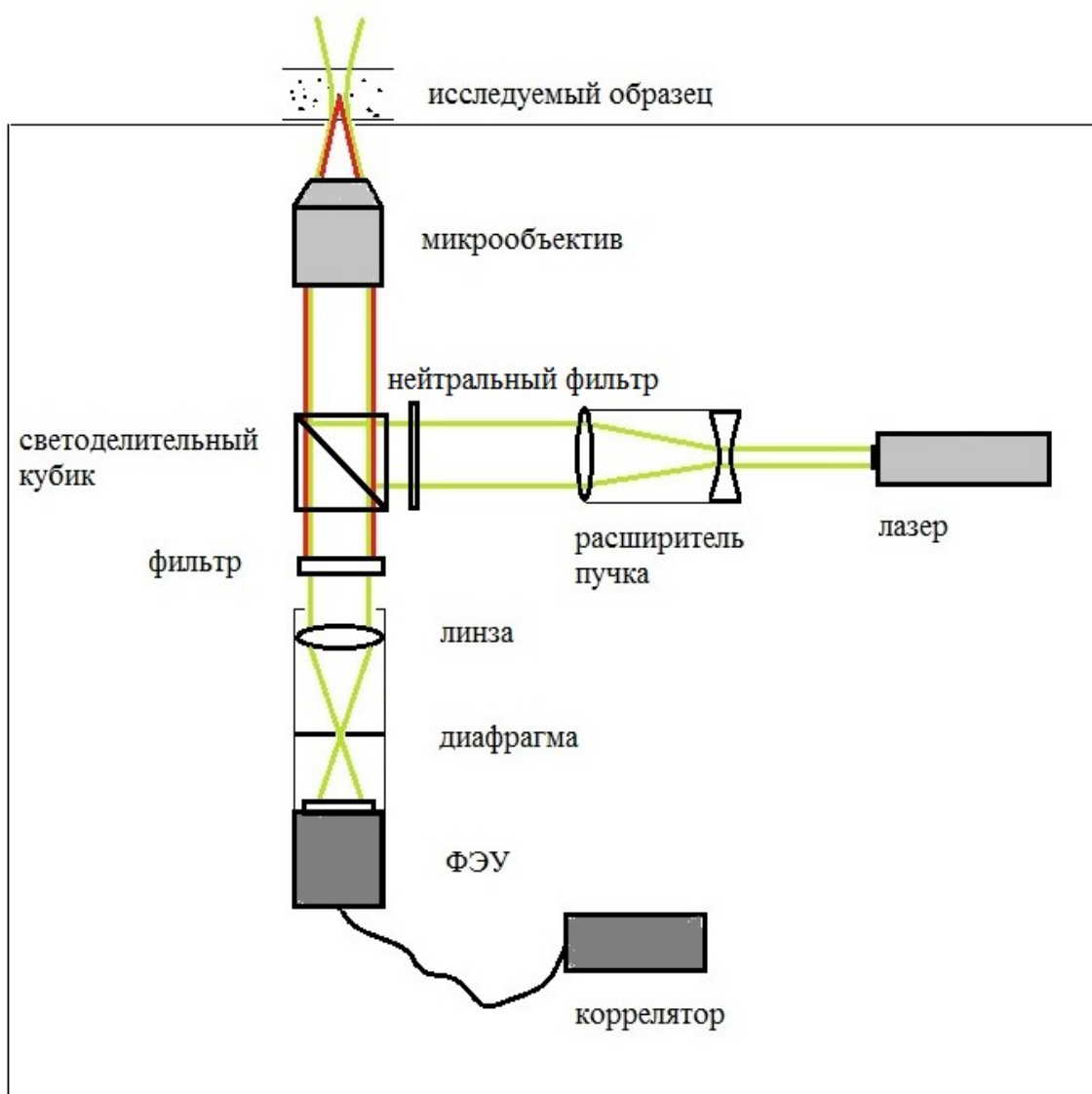


Рисунок 9. Схема собранной экспериментальной установки.

Ее конструкция и особенности компоновки оптических элементов соответствуют принципам конфокальной фильтрации детектируемого сигнала, описанным в предыдущей главе. В ходе сборки в приоритетные

задачи входило:

- 1) осуществление максимально точной юстировки лазера и оптических элементов для обеспечения максимального качества фокусировки луча на образце
- 2) установка конфокальной диафрагмы, обеспечивающей беспрепятственное детектирование люминесценции возбуждаемых молекул и эффективно отрезающей проходящее лазерное излучение, а также люминесценцию из-за пределов фокального объема
- 3) применение оптических фильтров, обеспечивающих лучшее соотношение сигнал-шум.

Непосредственно сами оптические элементы располагаются в жестком светонепроницаемом корпусе на двух параллельных оптических рельсах (Рисунок 10). Для наблюдения люминесценции от исследуемых образцов в верхней крышке корпуса имеется отверстие диаметром 30 мм, подразумевающее различные варианты расположения покровных стекол: либо непосредственно на самой крышке (для стекол размером 25\*25 мм), либо на специальном столике, смонтированном на крышке и способном перемещать образец в плоскости ХУ (т. е. плоскости, перпендикулярной распространению лазерного луча). Возможен и третий вариант — когда покровное стекло будет лежать непосредственно на объективе, что актуально для случая с масляной иммерсией.

Микрообъективы устанавливаются в стандартный тубус длиной 160 мм и резьбой стандарта RMS. Регулировка положения объективов осуществляется с помощью микрометрического винта.

Часть оптомеханических компонентов и элементов крепежа изготовлены в мастерской факультета по индивидуальным чертежам. Подробное описание использованного в ходе сборки оборудования, а так же самого процесса юстировки приведено ниже.



Рисунок 10. Фотография собранной экспериментальной установки.

## 2.1 Лазер

Для возбуждения люминесценции в исследуемых образцах применялся непрерывный твердотельный Nd:YAG – лазер, излучающий на второй гармонике с длиной волны 532 нм.

Крепление лазера позволяет установить его перпендикулярно оптическому рельсу и допускает его юстировку в плоскости рельса. Корпус лазера закреплен внутри полого алюминиевого цилиндра восемью винтами, которые позволяют менять угол наклона лазера с высокой точностью.

Исходный лазерный пучок расширялся с помощью двух линз: рассеивающей и собирающей, подобранных таким образом, чтобы диаметр

пучка на выходе составлял 8 мм (соответствует входной апертуре микрообъектива «40X»). Линзы размещаются внутри телескопической трубки, позволяющей расположить рассеивающую линзу точно в фокусе собирающей. Сама трубка крепится к корпусу лазера с помощью восьми винтов, позволяющих смещать линзы относительно оси лазера.

Юстировка лазерного луча заключалась в выставлении положения и угла наклона лазера таким образом, чтобы обеспечить падение луча на фронтальную линзу микрообъектива строго под прямым углом. Невыполнение этого условия приводит к образованию комы и, следовательно, к смещению фокальной перетяжки и нарушению ее формы.

Качество выполнения взаимной юстировки лазера, светоделительного кубика и тубуса с микрообъективом подтверждалось следующими фактами:

- 1) совпадение луча, отраженного от верхней грани светоделительного кубика, луча, отраженного от задней линзы микрообъектива (для юстировки использовался объектив «10X», так как для него наблюдалась наибольшая яркость вышеуказанного пятна) и луча, отраженного от покровного стекла, как в плоскости нижней грани кубика, так и в плоскости лежащей в самой нижней точки оптического рельса

- 2) попадание лазерного луча точно в центр фронтальной линзы объектива (оценивалось непосредственно по положению лазерного пятна на фронтальной линзе объектива «10X» и, дополнительно, с помощью миллиметровой бумаги при выкрученном из тубуса объективе

- 3) использование дополнительного красного лазера, закрепленного на крышке установки и съюстированного таким образом, чтобы испускаемый им луч распространялся строго параллельно оптическому рельсу (настройка осуществлялась с помощью диафрагмы, передвигаемой по рельсу); сопоставление хода зеленого луча, отраженного светоделительным кубиком вертикально вниз с ходом красного луча на всей длине

оптического рельса.

Кроме того, расширитель пучка фиксировался на корпусе лазера таким образом, чтобы его луч максимально точно попадал в оптические центры линз. Угловая расходимость луча после прохождения расширителя оценивалась экспериментально, ее значение не превышает  $0.4 \cdot 10^{-4}$  рад.

Дополнительное ослабление мощности лазера осуществлялось с помощью нейтральных светофильтров. Важно было максимально уменьшить люминесценцию молекул, находящихся за пределами фокального объема (в том числе и вызванную рассеянным в образце светом), а также уменьшить вероятность попадания в объектив рассеянного излучения, образовавшегося при прохождении лазерным пучком расширителя. Также немаловажно влияние мощности возбуждения на вероятность образования триплетных состояний.

## 2.2 Объективы

Для фокусировки лазерного излучения использовались ахроматические микрообъективы ЛОМО «40X» ( $NA = 0.65$ , воздушный) и «90X» ( $NA = 1.25$ , масляная иммерсия). Объективы с масляной иммерсией используются в отдельных трудах, посвященных ФКС, где исследуемые жидкости размещаются на покровных стеклах. Объективы, не использующие иммерсию, отдельно нигде не обсуждаются, хотя указываемые авторами многочисленных обзоров требования к значению числовой апертуры, никак прямым образом не противоречат возможности их применения. Таким образом, было вдвойне интересно оценить перспективы применения объектива «40X» с относительно небольшим значением  $NA$  в корреляционной спектроскопии.

Подробные сведения об объективах представлены в таблице 1:

Таблица 1. Сравнительные характеристики микрообъективов.

Объектив	«40X»	«90X»
Линейное увеличение	40 крат	90 крат
Числовая апертура	0.65	1,25
Иммерсия	отсутствует	масляная
Фокусное расстояние	4.3 мм	2.01 мм
Рабочее расстояние	0.55 мм	0.1 мм
Входная диафрагма	8 мм	4,8 мм
Система коррекции	ахромат	ахромат
Толщина покровного стекла	0.17 мм	0 — 0.17 мм
Спектральный диапазон	400 — 700 нм	400 — 700 нм
Парфокальная высота	33 мм	33 мм

При работе с объективом «90X» использовалось синтетическое нефлуоресцирующее иммерсионное масло АГАТ «ТИП-С», рассчитанное на применение в люминесцентных микроскопах. Спектральные характеристики такого иммерсионного масла приведены в таблице 2:

Таблица 2. Спектральные характеристики используемого иммерсионного масла.

Показатель преломления, $n_d(20^\circ C)$	$1.515 \pm 0.001$
Средняя дисперсия, $n_f - n_c$	$0.0106 \pm 0.0003$
Коэффициент пропускания спектральном диапазоне 500 — 700 нм при толщине слоя 10 мм	$> 0.95$
Кинематическая вязкость $(20^\circ C)$	$(2.2 \pm 0.1) * 10^{-4} \frac{M^2}{c}$

### 2.2.1 Расчет параметров фокальной области для используемых объективов

Расчет размеров и объема фокальной области необходим для вычисления диаметра конфокальной диафрагмы, а так же для оценки среднего числа флуоресцирующих молекул.

Согласно (1.14) за искомый объем можно принять объем следующего цилиндра (хотя аппроксимация фокального объема эллипсом является

более точной [27,29] ):  $V_{\text{фокал}} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0$  .

Согласно Аббе [28], для идеальных объективов

$$r_0 = \frac{\lambda}{2 NA} , \quad (2.1)$$

где  $\lambda$  — длина волны возбуждающего света, NA – числовая апертура объектива.

$z_0$  можно рассчитать согласно следующему выражению [29]:

$$z_0 = 2 \frac{0.88 \lambda}{(n - \sqrt{n^2 - NA^2})} , \quad (2.2)$$

где  $n$  – показатель преломления среды между объективом и образцом

Численные значения для конкретных объективов представлены в таблице 3:

Таблица 3. Рассчитанные фокальные параметры для используемых микрообъективов.

Тип объектива	«40X»	«90X»
Длина волны, $\lambda$	532 нм	532 нм
Числовая апертура, $NA$	0.65	1,25
$r_0$	$\approx 0.410$ мкм	$\approx 0.212$ мкм
$z_0$	$\approx 1.400$ мкм	$\approx 0.936$ мкм
$V_0$	1.31 фл	0.236 фл
$\frac{z_0}{v_0}$	3,5	4,4

Порядок полученных значений в целом совпадает с данными, приведенными в литературе, однако необходимо учитывать, что расчет проводился для идеальных систем без учета каких-либо aberrаций. Согласно [14,29], а так же довольно подробным исследованиям в [6] реальный измеряемый объем для объектива «90X» может составлять 0.5 – 1 фл при условиях идеальной юстировки и минимум 3 — 6 фл для «40X».

Кроме того, необходимо учитывать, что данные объективы имеют разную конструкцию [30] (рисунок 11), а следовательно и различную коррекцию aberrаций. Так, например, в [30] отмечается наличие у объективов «40X» значительных хроматических aberrаций.

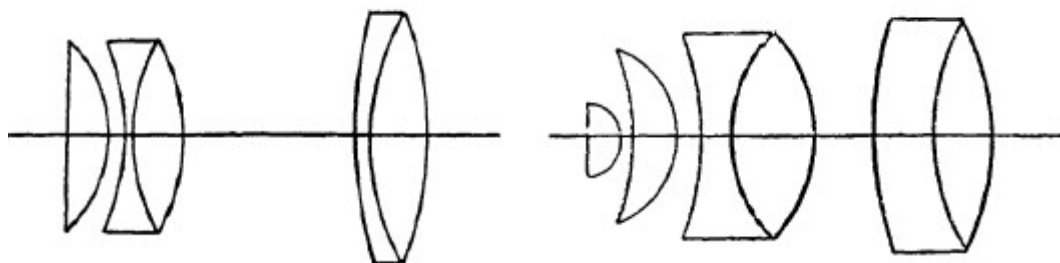


Рисунок 11. Конструкция микрообъективов-ахроматов «40X» (слева) и «90X» (справа). Взято из [30].



### 2.3 Конфокальная диафрагма

Для выделения люминесценции, испускаемой молекулами, находящимися в фокальном объеме применялась конфокальная диафрагма диаметром 30 — 35 мкм.

Данная диафрагма была изготовлена вручную из медной фольги толщиной 90 мкм (здесь и далее, где это возможно, измерение линейных размеров проводилось с помощью цифрового штангенциркуля Norgau ABS с ценой деления 10 мкм). Сам процесс изготовления выглядел следующим образом: сначала лист фольги подвергался термической обработке с помощью газовой горелки до приобретения им матового оттенка. Затем подбирались максимально острая швейная игла, профиль острия которой максимально соответствовал идеальному конусу. С помощью выбранной иглы в фольге очень аккуратно высверливалась лунка (сверление происходило до образования на обратной стороне фольги «горочки» высотой в 100 — 150 мкм). Далее вершина «горочки» аккуратно срезалась с помощью бритвенного лезвия. Размер получившихся отверстий оценивался с помощью микроскопа ЛОМО БИОЛАМ и эталонных нихромовых и вольфрамовых нитей диаметром соответственно 50 и 18 мкм.

Таким методом было изготовлено большое количество диафрагм, из которых была выбрана диафрагма, представляющая из себя максимально ровное круглое отверстие с диаметром не превышающим 40 — 50 мкм.

Изображение фокальной плоскости создавалось на диафрагме с помощью собирающей линзы с фокусным расстоянием в 5 см. Согласно (1.24), диаметр изображения, которое будет наблюдаться в фокальной плоскости такой линзы, составит 8.4 — 13.6 мкм (расчет для пучков диаметром 8 и 4.8 мм, диапазон длин волн 550 — 650 нм соответствует люминесценции органического красителя Родамина 6Ж, используемого в экспериментах).

Однако с учетом наличия у линзы хроматических и сферических aberrаций, а так же возможных погрешностей в юстировке, реальный диаметр получаемого изображения может быть несколько больше.

При сборке установки вместо упомянутой выше линзы была также осуществлена попытка использования микрообъектива-ахромата «10X» ( $f = 15.3$  мм,  $NA = 0.25$ ), которая, однако, не была успешной вследствие значительного увеличения интенсивности паразитной лазерной засветки, проходящей через диафрагму и вызванной лазерным лучом, отраженным от верхней грани светоделительного кубика вертикально вниз. Очевидно, что при идеальной юстировке такой луч должен совпадать с ходом луча люминесценции, тем не менее, при установленном вместо линзы объективе интенсивность проходящего лазерного пучка возрастала более чем на порядок, что критическим образом сказывалось на уровне сигнал-шум, определяющем эффективность экспериментальной установки.

#### 2.4. Фильтры

Для отрезания рассеянного лазерного излучения в экспериментальной установке использовался длинноволновый пропускающий (Longpass Filter или сокр. LP) интерференционный фильтр Thorlabs FELH 0550. Такой фильтр характеризуется высоким (Рисунок 12) коэффициентом пропускания в полезной области (спектральный диапазон люминесценции Родамина 6Ж) и значительным ослаблением (коэффициент пропускания -  $2.36 * 10^{-5}$ ) лазерного излучения на длине волны 532 нм.

Кроме того, в процессе юстировки ФЭУ применялись красные светофильтры КС 11 и КС 18. Их спектры пропускания представлены на рисунке 13 [31]. Вопрос о возможности применения фильтров такого типа в исследованиях, связанных с измерением корреляционной функции

флуоресценции, будет отдельно рассмотрен в главе 3.

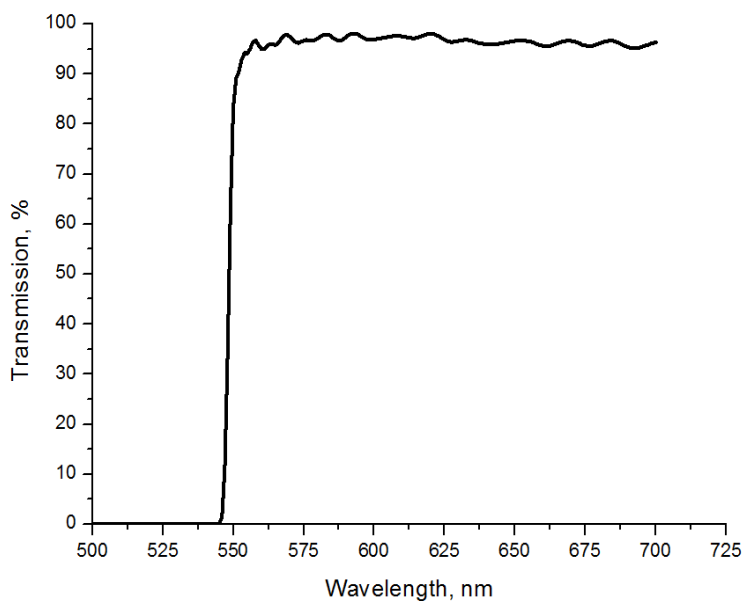


Рисунок 12. Спектр пропускания LP фильтра Thorlabs FELH 0550.

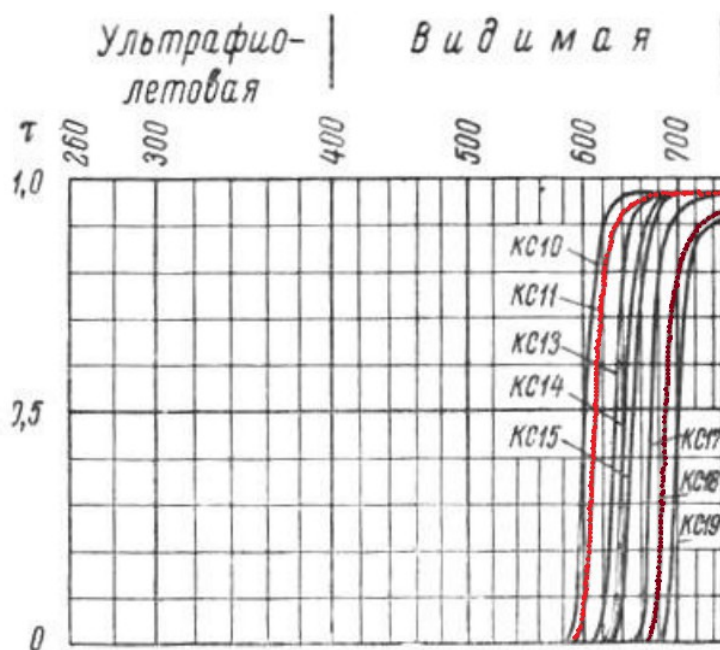


Рисунок 13. Спектры пропускания красных светофильтров. Спектры фильтров КС 11 и КС 18 дополнительно выделены светло- и темно-красным цветом соответственно. Взято из [31] с изменениями.

Коррекция мощности лазерного излучения осуществлялась с помощью нейтральных светофильтров НС №8 и НС №10 (таблица 4).

Таблица 4. Характеристики нейтральных светофильтров

№ фильтра	8	10
Оптическая плотность D ( $\lambda=532\text{нм}$ )	1.48	2.95
Коэффициент пропускания T ( $\lambda=532\text{нм}$ )	0.033	0.001

## 2.5 ФЭУ

В качестве фотоприемника в данной работе применялся ФЭУ-79, предназначенный для измерения предельно малых световых потоков в широкой области спектра. ФЭУ такого типа получили широкое распространение в исследованиях, связанных с астрономией, астрофизикой и спектральным анализом. Основные характеристики ФЭУ-79, имеющие значимость в контексте данной работы, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Некоторые характеристики ФЭУ-79

Катод	сурьмяно-натриево-калиево-цезиевый
Область спектральной чувствительности	300 — 830 нм
Область максимальной спектральной чувствительности	400 — 440 нм
Чувствительность фотокатода	> 120 мкА/лм
Число каскадов усиления	11
Диаметр рабочей площади катода	6 мм
Величина темновых импульсов (для конкретного ФЭУ)	< 300гц

ФЭУ работал в режиме счета одиночных импульсов. Измеренная интенсивность темновых импульсов представлена на рисунке 14:

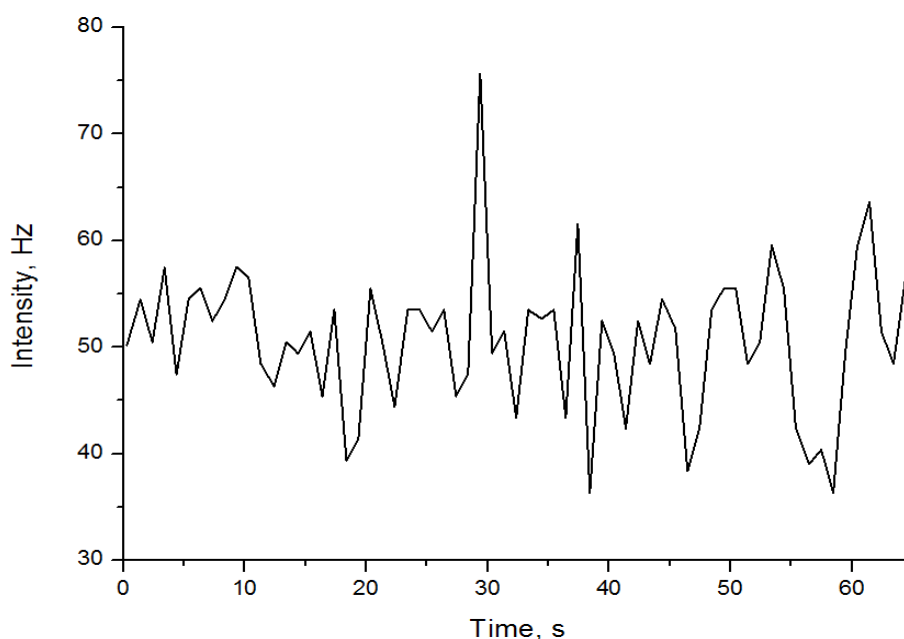


Рисунок 14: Темновые импульсы ФЭУ.

Сигнал с ФЭУ после прохода усилителей и дискриминатора подавался на корреляционную плату, установленную в ПК.

Непосредственно сам фотоприемный модуль, а так же каскады усиления и дискриминатор располагаются в цилиндрическом корпусе, фиксирующемся в оптическом рейтере с помощью специального крепления, оснащенного микрометрическими винтами. Наличие таких винтов позволяет передвигать ФЭУ в плоскости ХУ, а также менять углы его наклона с очень высокой точностью.

К основному цилиндру с помощью винтов прикручивается дополнительный модуль, предусматривающий возможность установки различных комбинаций линз/диафрагм. В конкретной работе в самую нижнюю точку модуля, в имеющееся отверстие диаметром 1 см, вкручивалась шайба с отверстием посередине, на которое наклеивался кусочек фольги с продланной в ней конфокальной диафрагмой.

Расстояние от диафрагмы до фотокатода  $\sim 2$  см. Фокусирующая линза, зафиксированная в плоской латунной оправе, устанавливалась на коаксиальный цилиндр из оргстекла с внутренним диаметром 1 см, длина которого была подобрана таким образом, чтобы конфокальная диафрагма находилась точно в фокусе. Сверху модуль закрывался металлической крышкой, имеющей отверстие по центру диаметром 1 см. Подобная входная диафрагма дополнительно отсекает люминесценцию, идущую из-за пределов фокуса и часть рассеянного лазерного излучения, прошедшего через фильтры.

## 2.6 Коррелятор

Для измерения временных автокорреляционных функций использовался коррелятор Photocor-FC (Рисунок 14):



Рисунок 14. Корреляционная плата Photocor-FC.

Коррелятор устанавливается в ПК, в разъем PCI, однако представляет из себя автономное устройство, использующее центральный процессор

компьютера лишь на этапе обработки корреляционных функций. Для измерений использовалась логарифмическая шкала времени (multiple-tau), включающая в себя 36 секций, по 8 каналов в каждой. Минимальное время выборки составляло 10 нс.

Алгоритм работы Photocor-FC включал в себя выполнение следующих операций:

- 1) измерение сигнала  $I(t)$
- 2) задержка сигнала  $I(t)$  на время  $\tau$
- 3) умножение сигнала  $I(t)$  на задержанный сигнал  $I(t+\tau)$

интегрирование произведения  $I(t)*I(t+\tau)$ , вычисление корреляционной функции вида (1.6):

$$\begin{aligned}
 G(\tau) &= \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta I(0) \delta I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} = \frac{\langle (I(0) - \langle I \rangle)(I(\tau) - \langle I \rangle) \rangle}{\langle I \rangle^2} = \\
 &= \frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle - \langle 2\langle I \rangle I(\tau) \rangle + \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} = \frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} = \\
 &= \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} \tag{2.3}
 \end{aligned}$$

Используемый коррелятор работал под управлением программного обеспечения Photocore Software (рисунок 15), позволяющего вести запись зависимости интенсивности сигнала от времени с разрешением 1 с, измерять автокорреляционные функции и обрабатывать их методом кумулянтов.

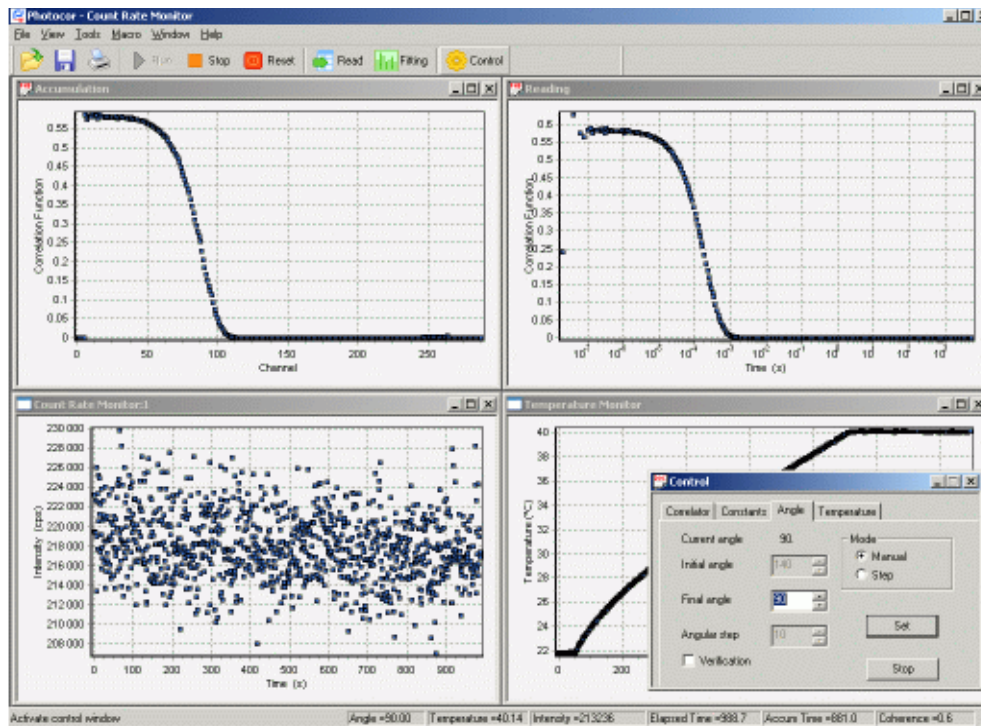


Рисунок 15. Скриншот ПО Photocore Software.

Для дополнительного анализа корреляционных кривых использовалась программа Dynals (рисунок 16):

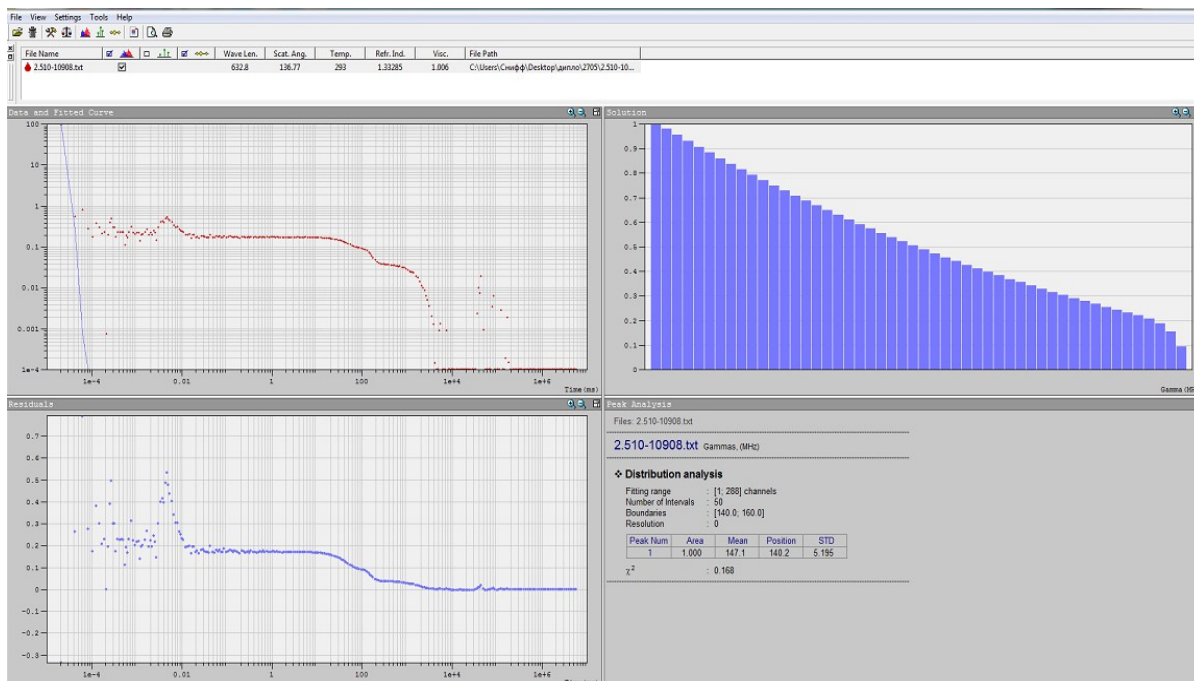


Рисунок 16. Скриншот программы Dynals.



Данное программное обеспечение, хотя и предназначается для анализа данных динамического рассеяния света, позволяет очень наглядно масштабировать измеренные корреляционные функции, вычислять времена и коэффициенты диффузии.

### ГЛАВА 3. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве калибровочного образца использовался органический краситель Родамин 6Ж (Р6Ж). Данный краситель изучался в пионерских работах по ФКС, его спектральные характеристики и фотофизические свойства также хорошо известны, что делает выбор в пользу Р6Ж полностью оправданным. Строение молекулы Р6Ж, его спектры поглощения и люминесценции представлены на рисунке 17 [27]:

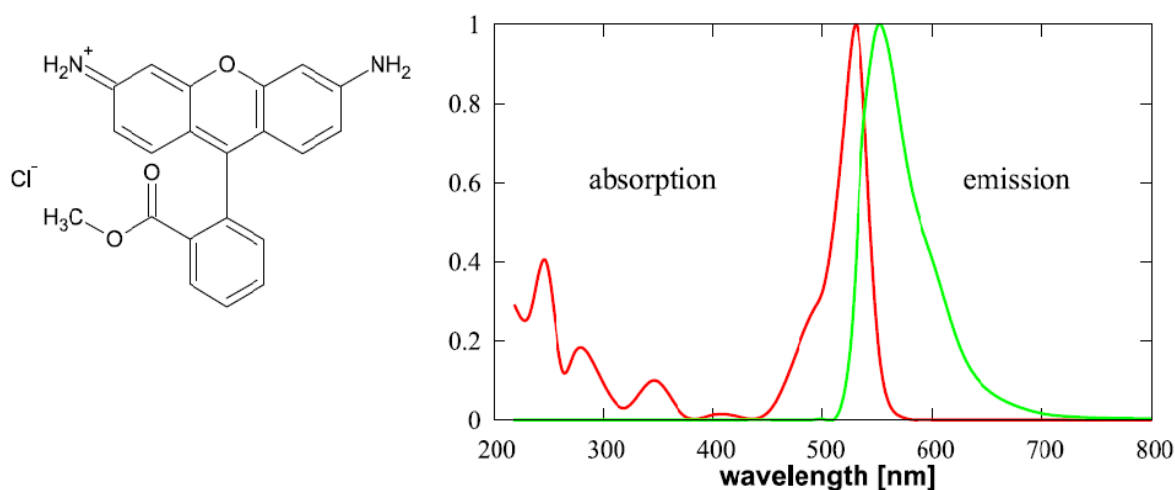


Рисунок 17. Строение молекулы Родамина 6Ж, спектры поглощения и люминесценции (в этаноле). Взято из [27].

В данной работе исследовались капли водяного раствора Р6Ж различных концентраций, выбор которых отвечал необходимости наблюдать люминесценцию от небольшого числа молекул при сохранении максимально возможного соотношения сигнал/шум. Применение дистиллированной воды в качестве растворителя позволило получать образцы со стабильной во времени концентрацией красителя (при среднем времени одного измерения  $\sim 2$  мин. ). В тоже время квантовый выход таких образцов остается весьма высоким, а спектры поглощения и

флуоресценции в сравнении с Р6Ж, разведенным в этаноле, остаются практически неизменными [27, 32]. Некоторые физические параметры, а так же спектральные характеристики, имеющие важное значение в контексте данного исследования приведены в таблице 6:

Таблица 6. Некоторые физические параметры и спектральные характеристики Родамина 6Ж

Максимум поглощения, $\lambda_{ex\ max}(H_2O)$	526 нм [32]
Максимум люминесценции, $\lambda_{em\ max}(H_2O)$	553 нм [32]
Молекулярная масса, $M$	479 г/моль
Коэффициент молярной экстинкции, $\epsilon$	78300 Моль <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> [32]
Квантовый выход, $\phi_f(H_2O)$	0.88 [32]
Коэффициент диффузии, $D(H_2O, 22.5^\circ C)$	426 $\frac{мкм^2}{с}$ [33]

В работе использовались концентрации Р6Ж, лежащие в пределах  $10^{-7}$  -  $10^{-10}$  моль/л. Расчеты числа частиц в фокальном объеме для исследованных концентраций представлены в таблице 7. В процессе юстировки также использовались концентрации  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$  моль/л, обеспечивающие яркую, видимую глазом при любом освещении люминесценцию.

Таблица 7. Предполагаемое число наблюдаемых молекул

Концентрация, $c$	Среднее число молекул в 1 фл объема, $N_{уд}$	Оценочное число молекул в фокальном объеме объектива «40X», $N_{40X}$	Оценочное число молекул в фокальном объеме объектива «90X», $N_{90X}$
$2 * 10^{-7}$ МОЛЬ/Л	120	157 — 720	28 — 120
$10^{-8}$ МОЛЬ/Л	6	8 — 36	1.4 — 6
$2 * 10^{-9}$ МОЛЬ/Л	1.2	1.6 — 7.2	0.3 — 1.2
$4 * 10^{-10}$ МОЛЬ/Л	0.24	0.32 — 1.44	0.06 — 0.24
$2 * 10^{-11}$ МОЛЬ/Л	0.012	0.016 — 0.72	0.003 — 0.012

Данные, приведенные в таблице выше, соответствуют фокальным объемам, рассчитанным в Главе 2 и приведенным в таблице 3. Такая оценка не учитывает несовершенства конфокальной фильтрации сигнала [6], а так же влияния мощности возбуждения на интенсивность люминесценции [20] ( в том числе и из-за пределов фокальной области). Реальные объемы могут значительно отличаться в большую сторону, что и обуславливает необходимость калибровки экспериментальной установки с помощью образцов с заведомо известными свойствами.

В целях уменьшения высоты возбуждаемого объема, а так же стабилизации положения капли на покровном стекле исследуемые образцы представляли из себя тонкие пленки высотой порядка нескольких десятков мкм. Для создания таких пленок капля раствора Р6Ж наносилась на покровное стекло между двумя нихромовыми проволочками диаметром 50 мкм. Сверху капля зажималась вторым покровным стеклом, проклеенным с внутренней стороны кусочком картона, покрашенным в черный цвет. Расстояние между проволочками выбиралось минимально возможное

(ограничено диаметром фронтальной линзы микрообъектива) в целях минимизации изгиба покровных стекол силами поверхностного натяжения, и составляло  $\sim 5$  мм. В таком положении исследуемый образец мог находиться неподвижно на протяжении времени проведения эксперимента.

Объектив «90X» располагался вплотную к нижнему покровному стеклу, объем между стеклом и передней линзой заполнялся иммерсионной жидкостью. Для объектива не использующего иммерсию задача точной фокусировки на тонкой пленке усложняется с уменьшением концентрации, и при концентрациях РБЖ  $< 10^{-8}$  моль/л становится труднорешаемой. В свете вышесказанного было принято решение выполнить фокусировку на образце с концентрацией  $10^{-5}$  моль/л, после чего намертво закрепить положение выдвигной части тубуса с помощью изоляционной ленты.

## ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Сравнительный анализ фильтров различных типов

Во всех рассмотренных работах, посвященных ФКС, начиная с самых ранних, для уменьшения паразитной засветки, вызванной отражением лазерного луча от многочисленных оптических поверхностей, а так же рассеянием на молекулах воды, применялись интерференционные фильтры, как узкополосные, так и пропускающие излучение в широком диапазоне длин волн. В то же время, возможности обычных цветных стекол с точки зрения рассмотренных спектров пропускания выглядят сопоставимыми с характеристиками фильтра Thorlabs, который изначально планировался как основной в исследованиях люминесценции от малых концентраций родамина (рисунки 12 и 13, Глава 2). Результат сравнения фильтров, описанных в главе 2 приведен в таблице 8:

Таблица 8. Сравнение эффективности фильтров

Фильтр	Интенсивность <sup>1</sup> паразитной засветки	Интенсивности люминесценции
FELH 0550	~ 20000 гц	~3500 кгц
КС 11	~15000 гц	~300 кгц
КС 18	~4500 гц	~90 кгц

Приведенные выше данные наглядно демонстрируют эффективность светофильтров КС 11 и КС 18 в блокировании зеленого излучения. Необходимо отметить, что КС 11 обладает достаточно яркой люминесценцией, хорошо заметной даже невооруженным глазом, в

---

<sup>1</sup> Здесь и далее под интенсивностью подразумевается число импульсов в единицу времени, зарегистрированных ФЭУ.

отсутствие которой интенсивность сигнала, дошедшего до ФЭУ была бы заметно ниже. С пропусканием сигнала от РБЖ дела у светофильтров в сравнении с FELH 0550 обстоят уже не так хорошо. Очевидно, что и КС 11 и КС 18 либо отсекают полностью, либо очень сильно уменьшают люминесценцию на длинах волн, близких к максимуму излучения РБЖ, оставляя лишь небольшой «хвост» в длинноволновой области. Ситуация усугубляется тем, что чувствительность ФЭУ максимальна в «синей» области видимого спектра и, возможно предположить ее монотонный спад вплоть до красной границы фотоэффекта.

С учетом приведенных результатов в экспериментах по анализу люминесценции от малого числа частиц фильтры КС 11 и КС 18 не использовались.

#### 4.2 Определение соотношения сигнал/шум для различных концентраций красителя

Корреляционные методы в общем случае не предусматривают изучение спектров детектируемого излучения, что делает возможным анализировать характер излучения, попадающего на детектор только на основе предварительно измеренного соотношения сигнал-шум. С помощью методов, описанных ранее, удалось значительно уменьшить число нежелательных фотонов, попадающих на фотокатод ФЭУ, однако итоговый уровень фонового шума все равно получился весьма значительным. И если для большого ансамбля излучающих молекул уровень сигнал-шум данного спектрометра можно признать отличным, то для измерения флуоресценции от одной молекулы он, вероятно, недостаточен. Наблюдаемые в эксперименте соотношения сигнал-шум для различных концентраций представлены в таблице 9. Лазерный пучок предварительно пропускался через нейтральные фильтры №8 и №10.

Таблица 9. Соотношение сигнал-шум для различных концентраций красителя

Концентрация, <i>c</i>	Объектив «40X»				Объектив «90X»			
	Интенсивность сигнала <sup>1</sup>		Сигнал-шум		Интенсивность сигнала		Сигнал-шум	
	НС №8	НС №10	НС № 8	НС №10	НС №8	НС №10	НС №8	НС №10
$2 * 10^{-7}$ моль/л	40 кгц	4 кгц	1.67	1.33	13 кгц	700 гц	5	1.4
$10^{-8}$ моль/л	38 кгц	3.7 кгц	1.58	1.23	4 кгц	550 гц	1.54	1.1
$2 * 10^{-9}$ моль/л	44 кгц	4.1 кгц	1.83	1.37	16 кгц	700 гц	~6	1.4
$4 * 10^{-10}$ моль/л	24 кгц	2.7 кгц	~1	~1	2.5 кгц	450 гц	~1	~1
$2 * 10^{-11}$ моль/л	25 кгц	3 кгц	~1	~1	2.75 кгц	500 гц	~1	1
$H_2O$	24 кгц	3 кгц	-	-	2.6 кгц	500 гц	-	-

Из данных, приведенных в таблице 9, видно, что ФЭУ детектируется некоторая люминесценция при концентрациях  $\sim 10^{-7}-10^{-8}$  моль/л. Интерпретация сигнала от более низких концентраций затруднена. Очевидно, однако, что интенсивность паразитной лазерной засветки, попадающей на фотоприемник, для объектива с масляной иммерсией значительно ниже. Соотношение сигнал-шум для обоих объективов во многих случаях совпадает, тем не менее, если учесть, что число молекул, возбуждаемых через объектив «40X» ориентировочно на порядок больше аналогичного количества для «90X», то разница в интенсивностях, представленная в таблице, выглядит обоснованной и не может выступать в

<sup>1</sup> Значения измеряемых интенсивностей претерпевали сильные изменения, иногда даже в рамках одного измерения, что, по-видимому, связано с нестабильностью мощности излучения лазера.



качестве однозначного критерия эффективности используемых объективов.

Оцененные значения отношения сигнал-шум для актуальных концентраций РБЖ лежат в пределах 1 — 2, что делает данную установку гораздо менее эффективной в сравнении с установкой из работы [20], где типичный сигнал-шум  $\sim 40$ .

Отдельные аномалии измеренных интенсивностей (например, как для концентраций  $2 \cdot 10^{-9}$  моль/л) связаны, по-видимому, с наличием посторонних примесей в образце, либо на покровном стекле.

### 4.3 Измеренные автокорреляционные функции

Характерный вид автокорреляционных функций, описывающих простую диффузию представлен на рисунке 18 [27]:

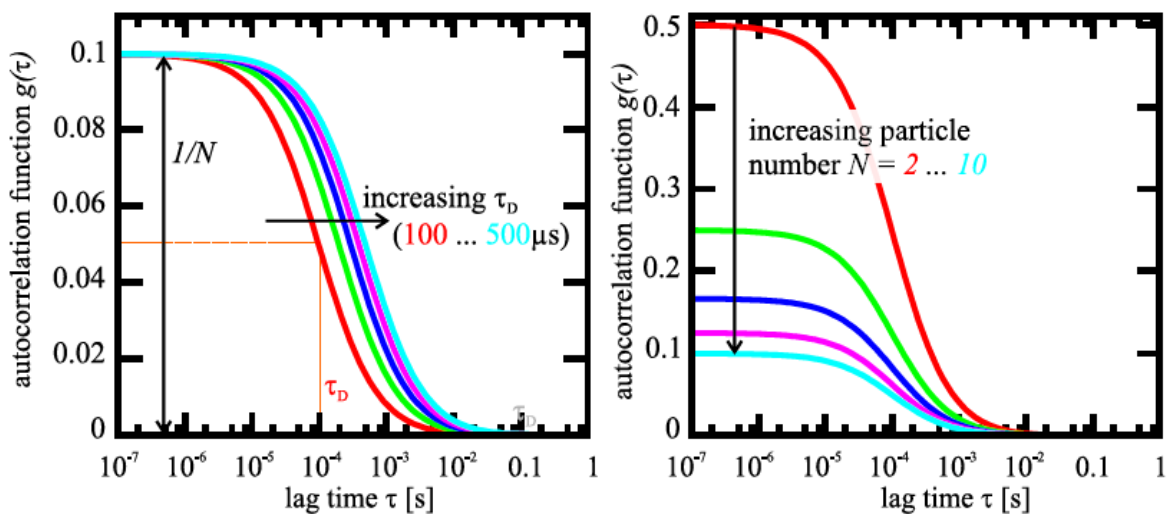


Рисунок 18. Анализ диффузии с помощью автокорреляционных функций. Взято из [27].

Анализ таких функций позволяет определить число излучающих молекул, характерные времена трансляционной диффузии, а с учетом того, что для РБЖ коэффициент диффузии известен, выражение (1.12) позволяет довольно точно оценить объем реального фокального пространства.

Из ранних работ, посвященных исследованиям Р6Ж методом ФКС [6,20], времена диффузии последнего известны и составляют 40 — 200 мкс (при мощности лазера ~1 мВт до 1000 мкс), а амплитуда автокорреляционной функции возрастает прямо пропорционально уменьшению числа диффундирующих частиц, что находится в согласии с выражением (1.16).

Характерная автокорреляционная функция, измеренная экспериментально, показана на рисунке 19:

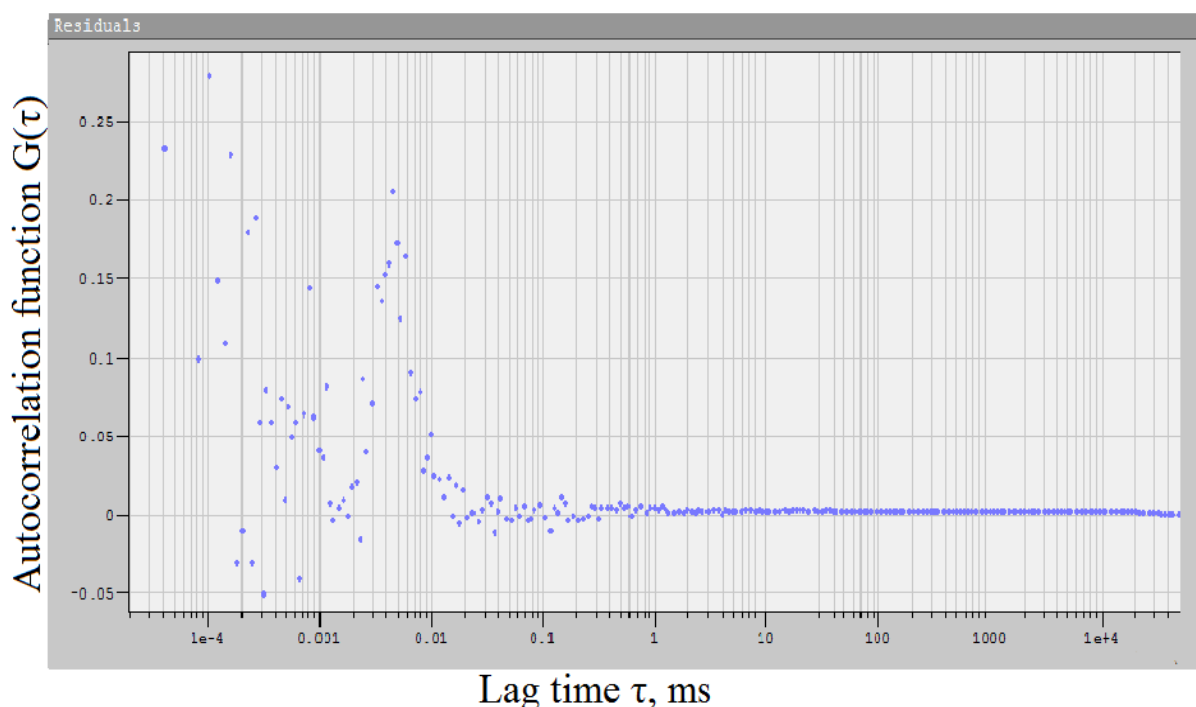


Рисунок 19. Измеренная автокорреляционная функция люминесценции Р6Ж. Концентрация  $10^{-8}$  моль/л.

Данная кривая была получена при концентрации Р6Ж  $10^{-8}$  моль/л, с использованием объектива «90X» и нейтрального фильтра НС №8, но подобного рода результаты наблюдались практически при всех измеренных концентрациях и на различных конфигурациях экспериментальной установки. Несколько более наглядно выглядит фрагмент такой функции в логарифмическом масштабе (Рисунок 20):

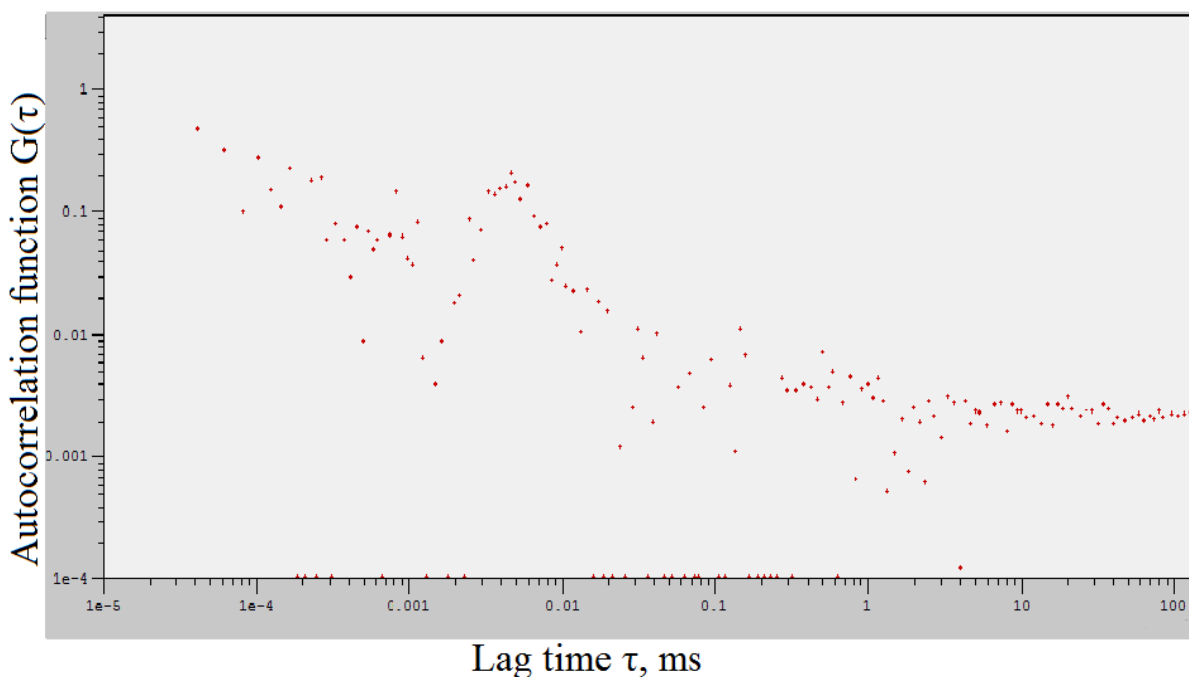


Рисунок 20. Фрагмент вышеуказанной автокорреляционной функции в логарифмическом масштабе.

При временах  $\tau$  порядка десятков — сотен мкс наблюдается некоторое подобие характерного спада функции, аналогичного тому, что приведен на рисунке 13. Однако, если такой спад действительно вызван диффузией, то время диффузии  $\tau_D$  составляет  $\approx 8$  мкс, что соответствует  $r_0 = 117$  нм, что приблизительно в два раза меньше значения, рассчитанного теоретически, и значительно меньше значений, полученных Риглером и коллегами.

Записанная автокорреляционная функция для лазерного излучения, попадающего в ФЭУ, (рисунок 21) полностью подтверждает опасения: характер кривой при временах в пределах 10 мкс никак не связан с диффузионными процессами и, возможно, связан с послеимпульсами ФЭУ.

Интересен так же факт, что в лазерном излучении определяется некоторая корреляция (рисунок 22) для времен  $\tau$  вплоть до нескольких секунд.

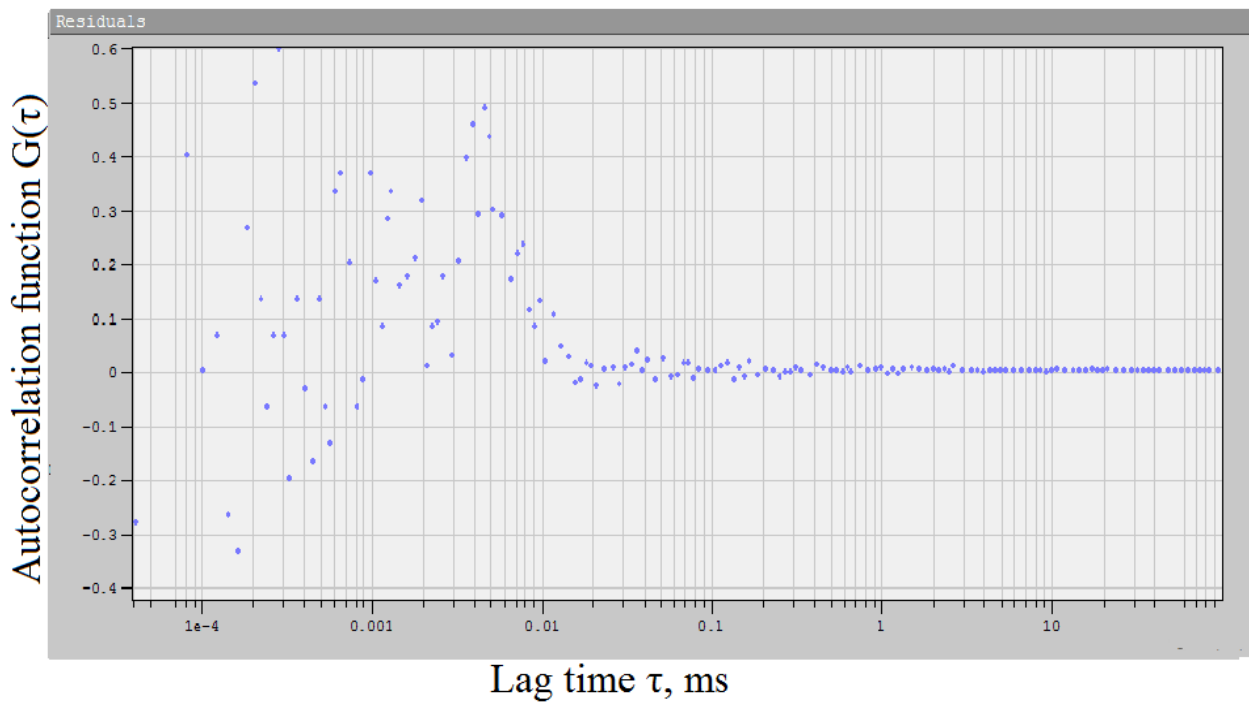


Рисунок 21. Автокорреляционная функция лазерного излучения.

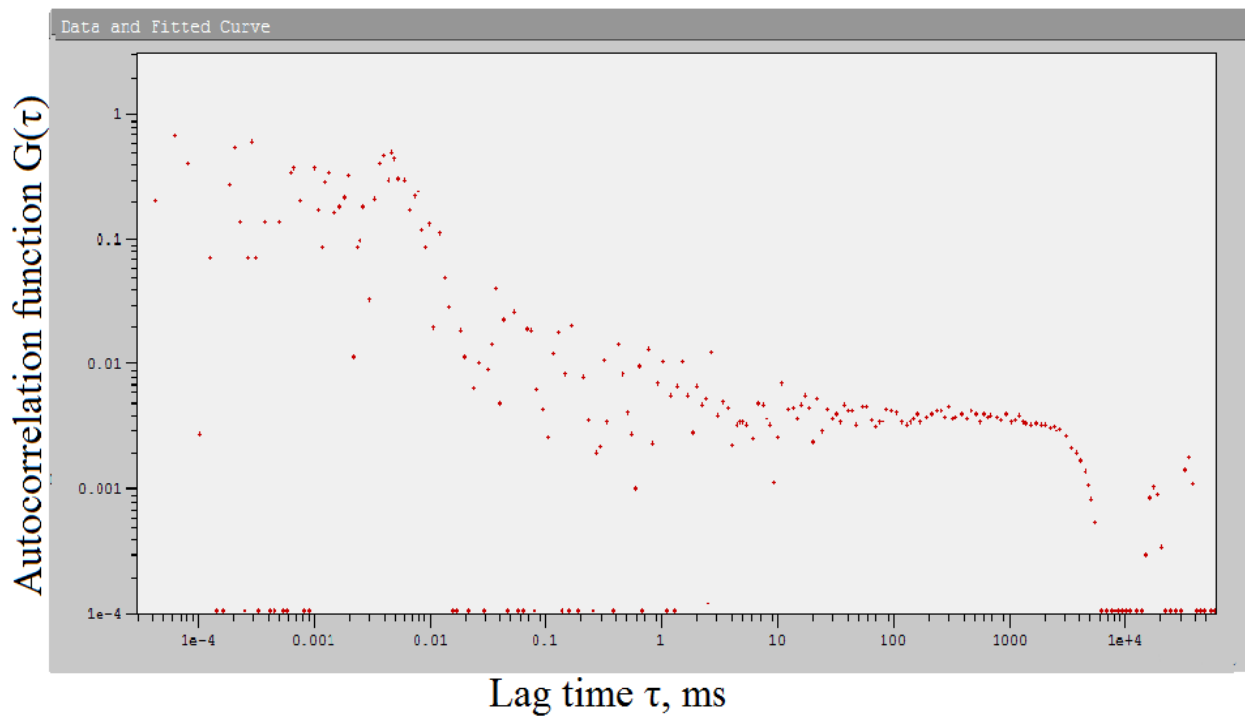


Рисунок 22. Фрагмент автокорреляционной функции лазера в логарифмическом масштабе.

Подобный характер корреляционных функций, с амплитудами  $\sim 0.005 - 0.1$  и резкими спадами при временах задержки порядка нескольких секунд наблюдался в том или ином виде для всех исследованных образцов. На рисунке 23 автокорреляционная функция для концентрации  $4 \cdot 10^{-10}$  моль/л (объектив «40X»):

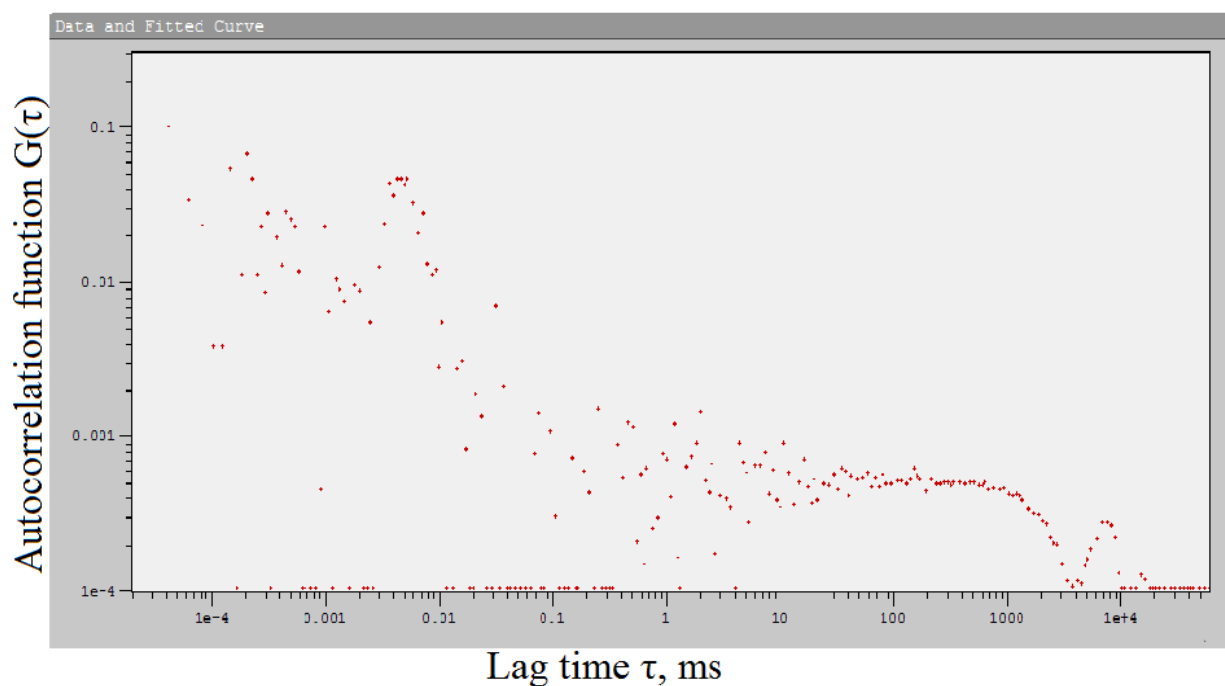


Рисунок 23. Автокорреляционная функция для концентрации Р6Ж  $4 \cdot 10^{-10}$  моль/л в логарифмическом масштабе Объектив «40X».

#### 4.4. Анализ полученных результатов

Однотипный характер полученных автокорреляционных функций демонстрирует их независимость от диффузии одиночных молекул. Очевидно, что на ФЭУ поступает определенное излучение, однако при малых концентрациях водяного раствора родамина бЖ оценить с высокой точностью какую часть от измеряемого сигнала составляет люминесценция от молекулы (или молекул), находящейся в фокальном объеме, весьма

затруднительно. Исходя из интенсивности сигнала при концентрациях вплоть до  $10^{-11}$  моль/л, фотоприемником регистрируется флуоресценция, однако временные треки, записываемые коррелятором с временным разрешением в 1 с, недостаточно информативны и не несут в себе информацию о процессах с характерными временами порядка миллисекунд и меньше.

Среди измеренных временных зависимостей интенсивности сигнала наибольший интерес представляет следующая кривая (рисунок 24), соответствующая концентрации Р6Ж  $4 \cdot 10^{-10}$  моль/л. Люминесценция возбуждалась при помощи объектива «90X».

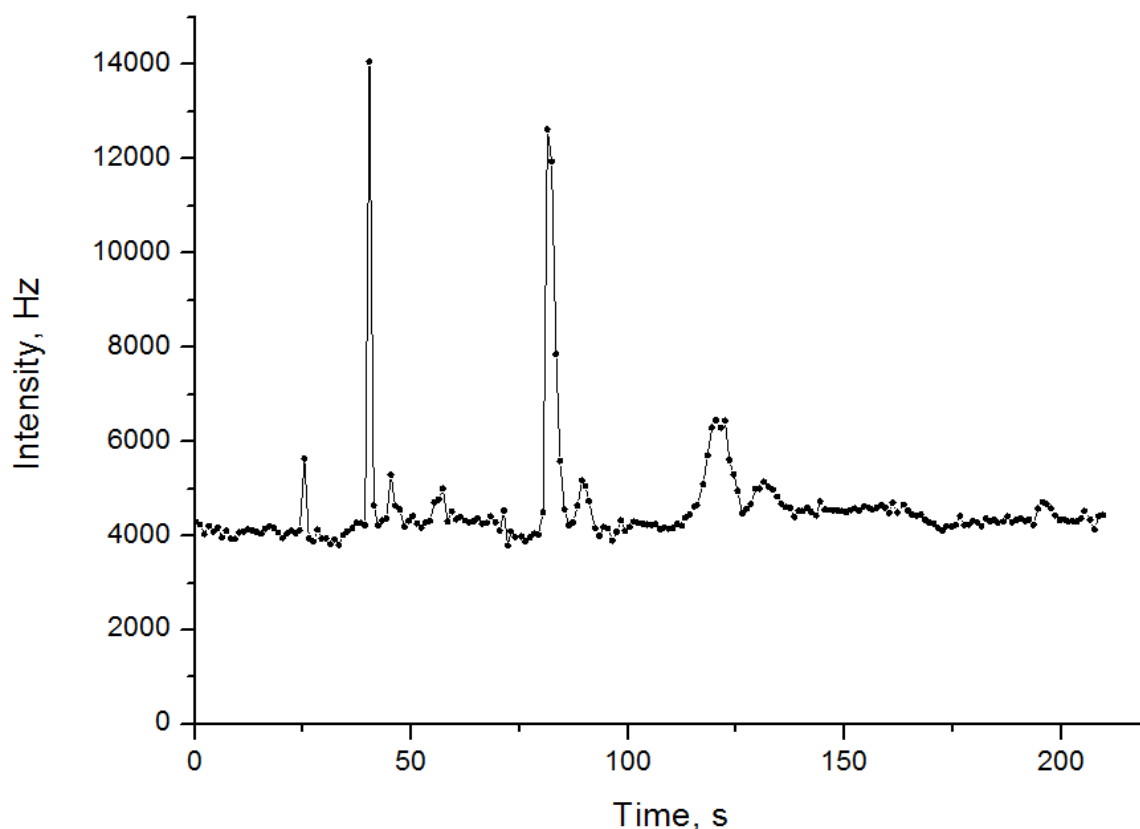


Рисунок 24. Зависимость интенсивности измеряемого сигнала от времени при концентрации красителя  $4 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

Вид данной кривой в целом соответствует соответствующим

люминесцентным трекам, записанным со столь большим временным разрешением, однако наличие «мерцающей» флуоресценции от одной молекулы обязательно бы отразилось на соответствующей автокорреляционной функции, чего, однако, не происходит (рисунок 25).

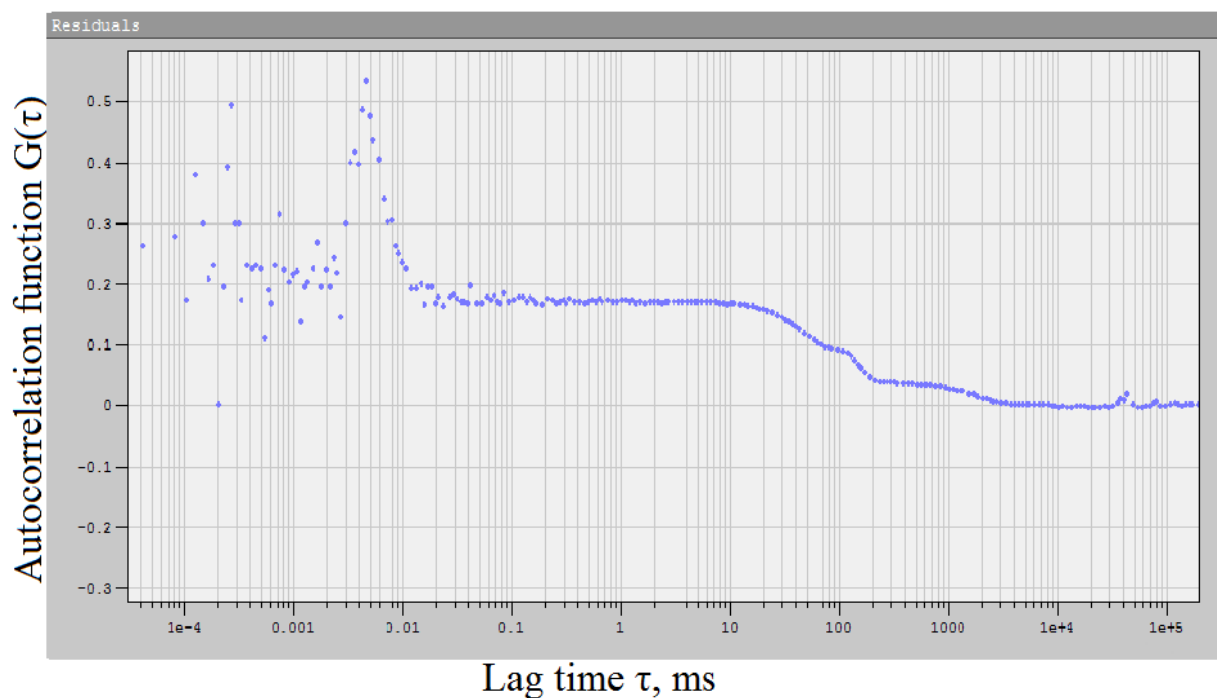


Рисунок 25. Автокорреляционная функция для концентрации Р6Ж  $4 \cdot 10^{-10}$  моль/л. Объектив «90X»

Интенсивность излучения от одиночной молекулы можно приблизительно оценить следующим образом. Пусть площадь фокального пятна  $\sim 0.2 \text{ мкм}^2$ , мощность лазера 10 мкВт, приблизительная площадь поверхности молекулы Р6Ж  $\sim 0.5 \text{ нм}^2$ , исследуемый объем содержит в среднем одну молекулу. Тогда на молекулу будет попадать мощность  $25 \cdot 10^{-12}$  Вт, что соответствует следующему количеству квантов зеленого света:  $25 \cdot 10^5$ . С учетом значения квантового выхода Р6Ж, чувствительности ФЭУ к фотонам в красной области видимого спектра, потерей на отражении от оптических поверхностей, регистрируемая интенсивность люминесценции от одной молекулы может быть несколько

ниже и составлять десятки кГц, что в теории может соответствовать скачкам интенсивности на рисунке 24.

С учетом всех приведенных экспериментальных данных необходимо сделать вывод, что данная экспериментальная установка требует принципиальных доработок и изменений в конструкции. Необходимыми условиями для качественного возбуждения видится применение системы термостабилизации мощности лазера, использование приборов для контроля его мощности. Также выглядит оправданным применение дихроичного зеркала вместо светоделительного кубика, что позволит сократить количество лазерного излучения, попадающего в ФЭУ до минимума. Использование одних лишь отрезающих фильтров в данной системе недостаточно. Также видится перспективной идея включения в экспериментальную схему спектрального прибора, который поможет характеризовать падающее на фотокатод излучение. В используемой схеме в силу ее компактности установить, например, монохроматор на один оптический рельс невозможно, однако подобную идею можно попробовать организовать с использованием откидного зеркала. Для возбуждения люминесценции оптимальным вариантом (исходя из прочитанного в литературе) видится применение микрообъективов с водяной иммерсией.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения магистерской диссертации были выполнены следующие задачи:

1) Создана экспериментальная установка с применением конфокальной фильтрации сигнала, позволяющая проводить вычисления корреляционных функций люминесценции

2) Отработаны навыки оптического эксперимента, предложена методика изготовления диафрагм размером 30-50 мкм

3) Проведен сравнительный анализ эффективности различных оптических элементов, входящих в собранную установку

4) Проведены исследования люминесценции одиночных молекул Родамина 6Ж, вычислены соответствующие корреляционные функции

5) Осуществлен анализ полученных результатов, отмечены возможные недостатки экспериментальной установки, предложены рекомендации для ее дальнейшего усовершенствования.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Д. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика: в 2-х томах //М.: КДУ. – 2010.
2. Magde D., Elson E., Webb W. W. Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy //Physical Review Letters. – 1972. – Т. 29. – №. 11. – С. 705.
3. Magde D., Elson E. L., Webb W. W. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization //Biopolymers. – 1974. – Т. 13. – №. 1. – С. 29-61.
4. Thompson N. L. Fluorescence correlation spectroscopy //Topics in fluorescence spectroscopy. – Springer US, 2002. – С. 337-378.
5. Qian H, Elson EL. Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy. Appl Opt 1991;30(10):1185-95.
6. Rigler R, Mets U, Widengren J, Kask P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low-background — analysis of translational diffusion. Eur Biophys J Biophys Lett 1993;22(3):169-75.
7. Haupts U. et al. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Т. 95. – №. 23. – С. 13573-13578.
8. Krichevsky O., Bonnet G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications //Reports on Progress in Physics. – 2002. – Т. 65. – №. 2. – С. 251.
9. Haustein E., Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy: an introduction to its concepts and applications //Biophysics Textbook Online. – 2004.
10. Widengren J., Mets U., Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study //The Journal of

Physical Chemistry. – 1995. – Т. 99. – №. 36. – С. 13368-13379.

11. Schwille P. et al. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – Т. 97. – №. 1. – С. 151-156.

12. Качмарек Ф. Введение в физику лазеров. – 1981.

13. Widengren J., Rigler R., Mets Ü. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy //Journal of Fluorescence. – 1994. – Т. 4. – №. 3. – С. 255-258.

14. Koynov K., Butt H. J. Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science //Current opinion in colloid & interface science. – 2012. – Т. 17. – №. 6. – С. 377-387.

15. Singh A. P. et al. The performance of 2D array detectors for light sheet based fluorescence correlation spectroscopy //Optics express. – 2013. – Т. 21. – №. 7. – С. 8652-8668.

16. Schwille P., Bieschke J., Oehlenschläger F. Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies //Biophysical chemistry. – 1997. – Т. 66. – №. 2-3. – С. 211-228.

17. Schwille, P.; in Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications, Elson, E.L.; Rigler, R. Eds., Springer, Berlin, (2001).

18. Rigler R. et al. Fluorescence cross-correlation: a new concept for polymerase chain reaction //Journal of Biotechnology. – 1998. – Т. 63. – №. 2. – С. 97-109.

19. Феофанов А. В. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ.

20. Mets Ü., Rigler R. Submillisecond detection of single rhodamine molecules in water //Journal of fluorescence. – 1994. – Т. 4. – №. 3. – С. 259-

264.

21. Petersen N. O. Scanning fluorescence correlation spectroscopy. I. Theory and simulation of aggregation measurements //Biophysical journal. – 1986. – T. 49. – №. 4. – С. 809-815.
22. Berland K. M. et al. Scanning two-photon fluctuation correlation spectroscopy: particle counting measurements for detection of molecular aggregation //Biophysical journal. – 1996. – T. 71. – №. 1. – С. 410-420.
23. Lamb D. C. et al. Sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection //Biophysical journal. – 2000. – T. 79. – №. 2. – С. 1129-1138.
24. Thompson N. L., Burghardt T. P., Axelrod D. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy //Biophysical journal. – 1981. – T. 33. – №. 3. – С. 435-454.
25. Greger K., Swoger J., Stelzer E. H. K. Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope //Review of Scientific Instruments. – 2007. – T. 78. – №. 2. – С. 023705.
26. Krieger J. W. et al. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy on a single plane illumination microscope (SPIM-FCCS) //Optics express. – 2014. – T. 22. – №. 3. – С. 2358-2375.
27. Kreiger J., Toth K., Langowski J. Practical course biophysics: absorption and Fluorescence Spectroscopy, Fluorescence Correlation Spectroscopy //German Cancer Research Center in the Helmholtz Association.
28. Xi P. (ed.). Optical Nanoscopy and Novel Microscopy Techniques. – CRC Press, 2014.
29. Wilhelm S. et al. Confocal Laser Scanning Microscopy. Principles //Microscopy from Carl Zeiss, microspecial. – 2003.
30. Тудоровский А. И. Теория оптических приборов, ч. 2 //М.: Изд-во АН СССР. – 1952.

31. Вейнберг И. Каталог цветного стекла //М.: Изд-во “Машиностроение” - 1967.
32. Reisfeld R. et al. The spectroscopic behaviour of rhodamine 6G in polar and non-polar solvents and in thin glass and PMMA films //Chemical physics letters. – 1988. – Т. 147. – №. 2-3. – С. 142-147.
33. Petrášek Z., Schwille P. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy //Biophysical journal. – 2008. – Т. 94. – №. 4. – С. 1437-1448.

