



ЗЕРКАЛЬНЫЕ КЮВЕТЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Н.Векшин*, д.б.н. / nvekshin@rambler.ru

Зеркальные кюветы предназначены для измерения флуоресценции слабо поглощающих растворов и суспензий наночастиц, регистрации спектров их возбуждения и излучения в видимой и УФ-областях, определения степени поляризации и времени жизни возбужденного состояния. Благодаря увеличению длины оптического пути возбуждающего света и добавочному светосбору излучения они обеспечивают многократное усиление интенсивности флуоресценции. Дополнительное усиление сигнала можно достичь сорбцией образца на помещаемой диагонально внутрь кюветы кварцевой пластинке.

Если наночастицы флуоресцируют или в них можно встроить краситель, для их изучения возможно использование разработанных в ИБК РАН зеркальных кювет, позволяющих усилить сигнал в несколько раз. Несколько типов таких изделий серийно выпускаются ООО "Фотон-век" (Пушино) [1, 2]. Они предназначены для измерения флуоресценции слабо поглощающих растворов, суспензий и тонких слоев [3-4]. Внешний вид кювет показан на рис.1, а схема их работы на рис.2.

В зеркальной кювете возбуждающий свет отражается нанесенным на внешние стороны кварцевой ячейки алюминиевым слоем. Снаружи покрытие защищено эмалью или лаком. Входящий

через узкое окошко во фронтальной зеркальной стенке кюветы возбуждающий свет, проходя сквозь раствор, попадает на противоположную зеркальную сторону, отклоняется и претерпевает внутри кюветы два или три отражения.

Излучение собирается под прямым углом, причем дополнительный светосбор обеспечивается зеркальной боковой стенкой кюветы, направляющей флуоресценцию в канал регистрации. В результате по сравнению с обычной кюветой, расположенной около вогнутых зеркал, создается 3-5-кратное усиление флуоресценции и световые потери и паразитная поляризация минимальны. Важно отметить, что зеркальная кювета может применяться

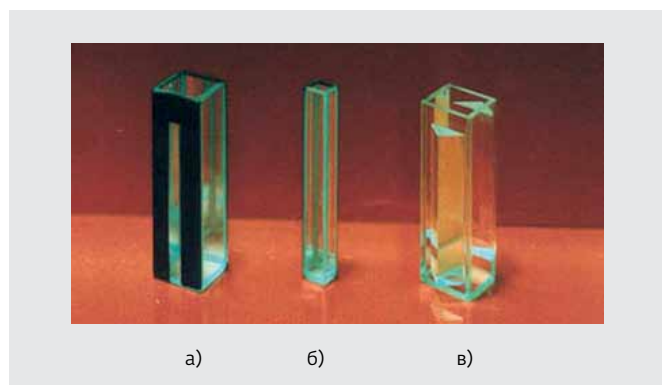


Рис.1. Зеркальная кювета (а); зеркальная микро-кювета (б); кювета полного внутреннего отражения (ПВО) (в)

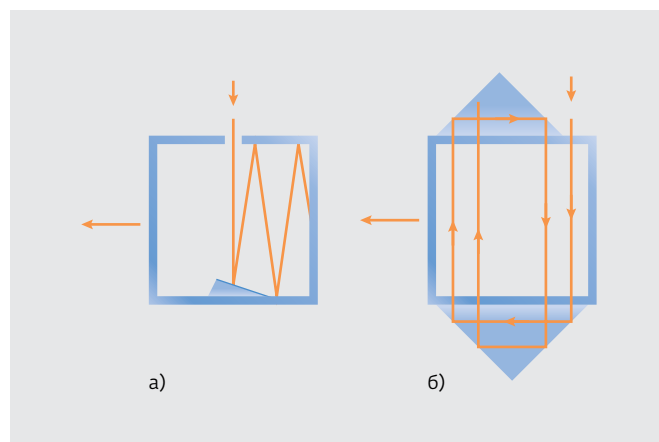


Рис.2. Схема работы кювет (вид сверху): зеркальной (а), ПВО (б). Стрелками показано направление хода световых лучей

* Институт биофизики клетки (ИБК) РАН, г.Пушино.



в различных спектрофлуориметрах без какой-либо их модификации.

Зеркальная микрокювета обеспечивает 3-4-кратное усиление интенсивности флуоресценции и позволяет использовать малые количества растворов (0,2–0,5 мл). Эта кювета фиксируется в специальном держателе, адаптированном по габаритам практически под все коммерческие спектрофлуориметры.

В кювете ПВО возбуждающий свет входит через узкое окошко в боковой части фронтальной грани и с помощью двух наружных приклеенных призм отражается четыре-шесть раз на границе кварц-воздух, а боковая зеркальная грань направляет излучение в канал регистрации. Если используется лазерный возбуждающий пучок, эта кювета позволяет обеспечить 4-10-кратное усиление интенсивности флуоресценции.

По сравнению со стандартной кюветой усиление (G) зеркальной кюветы определяется выражением:

$$G = (1 + \rho T + \rho^2 T^2 + \dots + \rho^n T^n)(1 + \rho),$$

где ρ – коэффициент отражения зеркального слоя или призмы; T – светопропускание раствора в полосе возбуждения при одном проходе света; n – число проходов. Первый множитель уравнения описывает усиление флуоресценции за счет многократного прохождения возбуждающего света, а второй учитывает дополнительный светосбор флуоресценции за счет боковой отражающей стенки.

Чем больше T (чем меньше оптическая плотность), тем G будет больше, стремясь, однако, к некоторому пределу. Реально для 1-см зеркальной кюветы с алюминиевым отражающим слоем величина $G=4-7$, а с серебряным для видимой области она составляет 6–9. Для кюветы ПВО при возбуждении лазерным пучком G достигает 10.

Использование зеркальных кювет особенно перспективно при фазово-модуляционных измерениях времени жизни возбужденного состояния, когда интенсивность возбуждения из-за узких щелей входного монохроматора и модулятора мала. Такие кюветы позволяют повысить точность измерения времени жизни (τ). Например, для спиртового раствора анилина-нафталено-сульфоната (АНС) разброс τ для стандартной кюветы превышал 0,5 нс ($\tau=7,7$ нс; измерено на SLM-4800 при частоте 30 МГц, возбуждение – 370 нм, щели – 1 нм), а в зеркальных кюветах этот же параметр был менее 0,1 нс.

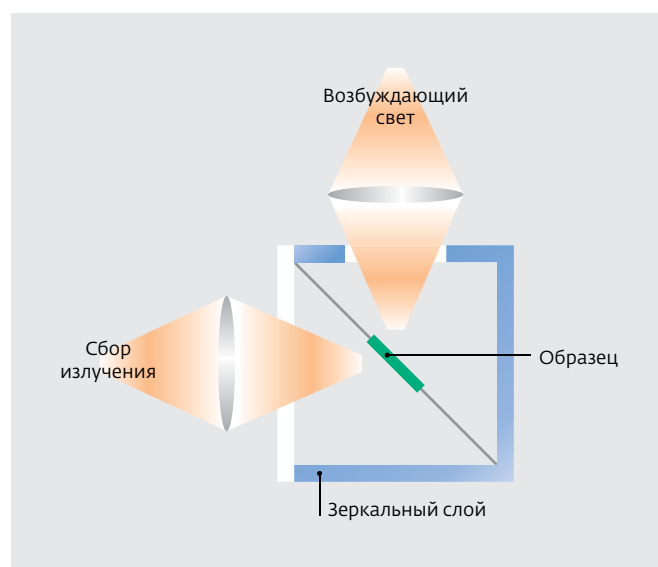


Рис.3. Зеркальная кювета с пластинкой (вид сверху). Образец в виде мазка или пленки расположен на стороне пластинки, обращенной к возбуждающему свету

Многоходовость не вносит заметного вклада в измеряемое время жизни в наносекундном диапазоне, поскольку на нескольких световых проходах запаздывание составляет всего около 0,1 нс. Для субнаносекундного диапазона необходимо проводить измерения в дифференциальном режиме, используя зеркальные кюветы на всех каналах и вводя поправки на задержку. Зеркальные кюветы полезны также при фиксации синхронных, резонансных и антистоксовых спектров, поскольку позволяют использовать близкие или даже одинаковые длины волн монохроматоров возбуждения и излучения.

Одна из модификаций зеркальных кювет – кюветы с диагональной пластинкой, на которой осуществляется сорбция или иммобилизация образца (рис.3). Для этих целей, в частности, можно использовать прозрачную кварцевую пластинку. Объект размещают точно в центре пластинки так, чтобы он соответствовал по форме размеру формируемого возбуждающей линзой светового пятна.

Обычная или зеркальная кювета с помещенной внутрь ее диагональной кварцевой пластинкой дополнительно обеспечивает резкое повышение сигнала флуоресценции. На рис.4 в качестве примера приведен спектр триптофановой флуоресценции белков митохондрий (природных частиц размером порядка одного мкм) в растворе, снятый в стандартной кювете



Рис.4. Спектр триптофановой флуоресценции белков митохондрий в водном растворе: стандартная кювета (1); зеркальная кювета с диагональной кварцевой пластинкой (2)

и на диагональной кварцевой пластинке в зеркальной кювете.

Зеркальная кювета обеспечивает гораздо большее усиление сигнала от образца на пластинке чем от растворенного. Односантиметровая зеркальная кювета чаще всего дает для растворенного образца усиление в 3–4 раза выше, чем стандартная. Для образца на пластинке она обеспечивает усиление в 3,5–5 раз выше, чем в стандартной кювете с таким же образцом на диагональной пластинке. В итоге суммарное усиление флуоресценции растворенного образца в зеркальной кювете с диагональной пластинкой по крайней мере на порядок выше в сравнении со стандартной кюветой. В таблице приведено сравнение флуоресценции некоторых веществ на пластинке и в растворенном виде. Из нее видно, что интенсивность флуоресценции всех образцов (красителя родамина Б, ароматического углеводорода пирена, аминокислоты триптофана и частиц митохондрий) при сорбции на пластинку в стандартной кювете и в зеркальной существенно возрастает. Максимальное усиление достигается при совместном применении пластинки и зеркальной кюветы.

В опытах пластинка устанавливалась в кювету по диагонали так, чтобы паразитный свет не попадал в канал регистрации и линзой обеспечивался максимальный сбор флуоресценции. Кювета с пластинкой заполнялась растворителем, причем показатель его преломления не слишком отличался от такового для кварца. Заполнение растворителем позволяет:

- устранить паразитные отражения на границах раздела;

Интенсивность флуоресценции ряда объектов в различных условиях на пластинке, диагонально фиксированной в кювете

Образец	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм	F2	F3	F4
Родамин Б	540	570	3,5	4,1	13,8
Пирен	335	390	3,3	3,8	11,9
Триптофан	280	350	3,1	3,5	10,1
Митохондрии	286	340	3,4	4,7	15,2

Примечание. Концентрации не выше 1 мкМ. Интенсивность флуоресценции растворенного образца в стандартной кювете принималась за 1; F2 – интенсивность флуоресценции растворенного образца в зеркальной кювете, F3 – интенсивность флуоресценции образца на пластинке в стандартной кювете, F4 – то же в зеркальной кювете.

- предотвратить попадание возбуждающего света в канал регистрации флуоресценции;
- предохранить образец от сильного нагрева возбуждающим светом;
- проводить измерения кинетических процессов.

На поверхности контактирующего с водой образца молекулы достаточно подвижны, что обуславливает возможность флуориметрического изучения кинетики химических и биохимических реакций.

Высокая интенсивность флуоресценции на пластинке связана с рядом причин. Во-первых, образец сконцентрирован в слой, в то время как в растворенном виде он распределен по объему кюветы. Во-вторых, на пластинке образец расположен в том месте, где находится фокус обеих линз. В-третьих, возбужденные молекулы образца в конденсированном состоянии меньше подвержены дезактивации (тушению), чем в воде. Еще одно преимущество при применении пластинки заключается в том, что фиксированный на ней образец можно использовать многократно, если после промывания помещать пластинку в нужную среду.

Литература

1. Патент РФ № 1254357. Зеркальные кюветы для флуоресцентного анализа, 1992.
2. Патент РФ № 1312452. Многоходовые кюветы для люминесцентных измерений, 1992.
3. Векшин Н.Л. Зеркальные флуоресцентные кюветы. – Оптическая техника, 1994, № 3, с.18–19.
4. Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. – Пущино: Фотон-век, 2008.