

УДК 535.37

ПРОГРАММНЫЙ МОДУЛЬ «ФЛУОТАУ» ДЛЯ АНАЛИЗА КИНЕТИКИ ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

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

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» БГУ

²Белорусский государственный университет

Минск, Республика Беларусь

Аннотация. Разработан программный модуль «ФлуоТау» для анализа затухания флуоресценции, методом время-коррелированного счета фотонов. Программный модуль «ФлуоТау» позволяет аппроксимировать кинетику затухания флуоресценции моделью до 5 экспонент, имеет большую гибкость в настройке начальных и граничных условий аппроксимации.

Ключевые слова: метод время-коррелированного счета фотонов, анализ кинетики затухания флуоресценции.

SOFTWARE MODULE "FLUOTAU" FOR FLUORESCENCE DECAY KINETICS ANALYSIS
Tarasau D.S.^{1,2}, Samtsov M.P.¹, Radzko A.E.¹, Krasnoperov N.N.¹, Shevchenko K.A.¹, Voropay E.S.²

¹A.N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University

²Belarusian State University

Minsk, Republic of Belarus

Abstract. A "FluoTau" software module has been developed to analyze the kinetics of fluorescence decay obtained using the time-correlated single photon counting method. The software module allows to approximate the fluorescence decay by 5 exponentials, and has great flexibility in setting the initial and boundary conditions of the approximation.

Key words: time-correlated single photon counting method, analysis of fluorescence decay kinetics.

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

Введение. Люминесцентный анализ один из наиболее информативных спектральных методов исследования объектов в различных областях науки. В последние два десятилетия с развитием аппаратуры для измерения временных характеристик свечения люминесценции его применение значительно расширилось. Получения кинетики затухания сегодня стал метод время-коррелированного счета фотонов. Прежде всего это обусловлено появлением мегагерцовых импульсных лазерных источников с субнаносекундной и пико-секундной длительностью, а также развитием микроэлектронной базы. Эталонным методом для получения кинетики затухания сегодня стал метод время-коррелированного счета фотонов. В лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко выполняется разработка лазерного спектрофлуориметра для спектрально-кинетического люминесцентного анализа в экспериментальной физике и биологии. Измерения кинетических характеристик флуоресценции предполагается реализовать по методу время-коррелированного счета фотонов. На данном этапе проекта разработаны прототипы/макеты отдельных узлов спектрофлуориметра: импульсных светодиодных и лазерных источников, время-амплитудного преобразователя (ВАП), схемы временной привязки (СВП), блока управления, одноквантового и КМОП-многоканального фотоприемных устройств (ОФУ и МФУ).

Параллельно ведется разработка программного обеспечения (ПО) для объединения отдельных узлов в единый программно-аппаратный комплекс, включая программный модуль «ФлуоТау» для анализа кинетики затухания флуоресценции. На базе спектрофлуориметра Fluorolog (SPEX, США) создан макет для апробации отдельных узлов и тестирования ПО.

Программный модуль для анализа кинетики затухания флуоресценции. Известно, что для однокомпонентных молекулярных систем характерным является одноэкспоненциальный закон затухания флуоресценции. В случае нескольких невзаимодействующих флуоресцирующих центров закон затухания будет представлен суммой экспонент:

$$I(t) = \sum_{i=1}^N a_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (1)$$

Поскольку длительности возбуждающего импульса и отклика регистрирующей фотосистемы нередко сопоставимы с временем затухания флуоресценции исследуемых объектов, то регистрируемый сигнал флуоресценции в момент времени t представляет собой свертку вида:

$$F(t) = \int_0^t G(t') I(t-t') dt', \quad (2)$$

где $G(t)$ – аппаратная функция, которая определяется как отклик системы регистрации на возбуждающий световой импульс.

Закон затухания флуоресценции исследуемых молекул можно установить путем решения задачи деконволюции. В его основе минимизация функционала χ^2 , который представляет собой взвешенное среднее квадратичное отклонение рассчитанного закона затухания флуоресценции $F_{\text{расч}}(t_i)$ от зарегистрированного $F_{\text{эксп}}(t_i)$:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n w_i [F_{\text{эксп}}(t_i) - F_{\text{расч}}(t_i)], \quad (3)$$

где w_i весовые коэффициенты:

$$w_i = \frac{1/F_{\text{эксп}}(t_i)}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 1/F_{\text{эксп}}(t_i)}. \quad (4)$$

Данный подход используется в разработанном программном модуле «ФлуоТау». Принимая во внимание нелинейную зависимость функционала χ^2 от t_i , для ускорения вычислений использован метод Левенберга-Марквардта для нелинейного метода наименьших квадратов [1]. Программный модуль выполнен в виде оконного приложения для системы Windows (рисунок 1).

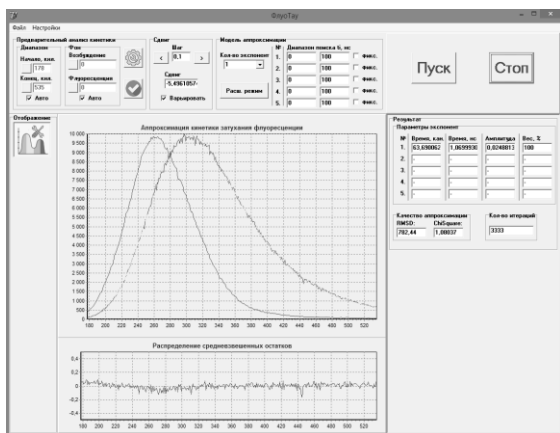


Рисунок 1 – Вид главного окна программного модуля «ФлуоТау»

В качестве варьируемых параметров в модель оптимизации также включен временной сдвиг между аппаратной функцией и кинетикой затухания флуоресценции образца.

Тестирование программного модуля. В процессе разработки программного модуля «ФлуоТау» корректность работы алгоритма расчета

проверена на сгенерированных модельных данных в виде свертки известной аппаратной функции и теоретического закона затухания, представленного суммой нескольких экспонент с известными временами затухания и весами (амплитудами).

В полученные кинетики дополнительно добавлялась шумовая компонента с разным уровнем шума. В результате анализа с помощью программного модуля «ФлуоТау» с использованием моделей аппроксимации от 1 до 5 экспонент наилучший результат аппроксимации достигался при совпадении количества экспонент в моделях генерации исходных данных и их аппроксимации. С использованием макета на базе спектрофлуориметра Fluorolog проведена апробация отдельных узлов лазерного спектрофлуориметра. Зарегистрированы кинетики затухания различных образцов с известными в литературе временами затухания флуоресценции (растворы красителей родамин 6Ж и НТС в этаноле). В результате аппроксимации полученных кинетик с помощью стандартного режима программного модуля «ФлуоТау» получены времена затухания флуоресценции, которые в пределах погрешности совпадают со значениями в литературе: родамин 6Ж в этаноле – 4,0 нс [2], НТС в этаноле – 1,4 нс [3].

Закключение. Таким образом, разработан программный модуль «ФлуоТау» для анализа кинетики затухания флуоресценции. Программный модуль «ФлуоТау» позволяет аппроксимировать кинетику затухания флуоресценции моделью до 5 экспонент, имеет большую гибкость в настройке начальных и граничных условий аппроксимации.

Литература

1. Grinvald, A. On analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares / A. Grinvald, I.Z. Steinberg // *Anal. Biochem.* – 1974. – Vol. 59. – P. 583.
2. Berezin, M.Y. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging / M.Y. Berezin, S. Achilefu // *Chemical reviews.* – 2010. – Vol. 110, №. 5. – P. 2641–2684.
3. Концентрационное увеличение квантового выхода образования синглетного кислорода индотрикарбониновым красителем / М.П. Самцов [и др.] // *Журнал прикладной спектроскопии.* – 2014. – Т. 81, № 2. – С. 219–227.