УДК 53.082.539, 53.083.98, 535-7, 577.112.7, 57.085.23, 57.083.16, 542.93

**Е.А.САВЧЕНКО**

*инженер, профессор высшей школы прикладной физики и космических технологий, Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого*

*E-mail: savchenko-spbstu@mail.ru*

*Тел.:+7(999)245-77-86*

**О.Б.КУЗНЕЦОВА**

*студентка высшей школы прикладной физики и космических технологий, Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого*

*E-mail:* [*belka3824@mail.ru*](mailto:belka3824@mail.ru)

*Тел.: +7(921)563-05-23*

**Е.Т.АКСЁНОВ**

*профессор высшей школы прикладной физики и космических технологий, Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого*

*E-mail:* [*et.aksenov@gmail.com*](mailto:et.aksenov@gmail.com)

*Тел.: +7(921)920-44-16*

**ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ РОДАМИНА 6G МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ В РЕЖИМЕ ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ**

***В статье рассмотрен способ регистрации одиночных молекул раствора родамина 6G методом флуоресценции в режиме полного внутреннего отражения***

***Ключевые слова: флуоресценция, полное внутреннее отражение, родамин 6G, глубина проникновения излучения, биомедицина, биофотоника, явления на поверхностях раздела двух сред***

В настоящее время наблюдается активный интерес к созданию оптических методов исследования биологических материалов, основанных на явлении флуоресценции. Используя данное явление, становится возможным выявлять пространственную локализацию флуорофоров в биоткани, что объясняется способностью флуорофоров связываться с другими молекулами. Детектирование одиночных наночастиц в режиме полного внутреннего отражения позволяет повысить точность проводимых измерений благодаря исследованию объектов в тонком слое порядка 100 нм, увеличить соотношения сигнал шум, уменьшить количество требуемого образца, проводить измерения, не нарушая структуру образца [5]. Данный метод широко используются в биомедицине, так как флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения позволяет наблюдать явления на поверхностях раздела двух сред [1]. Например, для изучения рецепторов, ионных каналов, а также многочисленных цитоскелетных и сигнальных молекул, расположенных на или вблизи мембраны клетки [2]. Флуоресцентная микроскопия на основе полного внутреннего отражения является одним из универсальных методов молекулярного анализа, позволяющего исследовать физико-химические и оптические свойства одиночных молекул.

Целью данной работы являлось создание оптического измерительного стенда для регистрации одиночных молекул методом флуоресцентной микроскопии в режиме полного внутреннего отражения, регистрация изображений флуоресцирующих молекул родамина 6G и отработка методики измерений.

Для достижения цели работы нами была разработана измерительная установка. Световой поток от лазерного модуля проходит через призму полного отражения, отражается на границе раздела и проходит через противоположную грань призмы, при этом часть электромагнитного излучения проникает в менее плотную среду, тем самым возбуждая флуоресценцию в исследуемом объекте. Далее сигнал флуоресценции проходит через фокусирующую линзу и детектируется с помощью ПЗС камеры. В данной работе была выбрана камера с низким уровнем шумов (62 дБ), высокой эффективностью, высокими спектральным (380-650 нм) и динамическим (50 дБ) диапазонами.

В качестве тестового образца был использован раствор родамина 6G. Родамины интенсивно поглощают электромагнитное излучение видимого и УФ диапазонов спектра. Поэтому для возбуждения флуоресценции можно применять источник как видимого, так и УФ света. Родамин 6G – классический лазерный краситель, обладает высокой фотостабильностью, высоким квантовым выходом флуоресценции (0,95) и низкой стоимостью [3]. Самое выраженное свойство родамина 6G — это узкий спектральный диапазон поглощения. Как известно, длина возбуждения флуоресценции данного красителя лежит в пределах 526 нм [4]. Поэтому в качестве источника излучения был выбран лазер с длинной волны 532 нм. В данном случае показатели преломления родамина (n2=1,332) и стекла (n1=1,518) [6]. Если n1>n2, а угол падения больше критического, происходит полное внутреннее отражение в стекле. Следовательно, можно рассчитать θс для данной схемы: θс = arcsin (1,14) = 48,7°. Соответственно, глубина проникновения зондирующего излучения равна d(θ) = 219 нм.

Правильный подбор угла падения излучения, а также ПЗС камеры с оптимальными характеристиками позволил получить изображения флуоресцентных центров определить местоположение флуоресцентных молекул в исследуемом образце. Полученным изображение тестового образца с ПЗС-камеры представлено на рисунке 1.

Рис.1. Изображения с ПЗС-камеры от раствора родамина 6 G.

По полученным результатам можно сделать вывод о работоспособности, выбранной методики исследований и высокой чувствительности измерительной установки, позволяющей фиксировать флуоресценцию на уровне одиночных молекул.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Зубова Н.Н. Савицкий А.П. Молекулярные клеточные сенсоры, созданные на основе цветных флуоресцирующих белков. ― М.: Университетская книга, 2005. ― 454 с.
2. Ненашева Т. А., Машанов Г. И. Визуализация одиночных флуоресцирующих молекул в живых клетках //Биофизика. – 2006. – Т. 51. – №. 3. – С. 454-465.
3. Савченко Е.А., Непомнящая Э.К., Дюбо Д.Б., Величко Е.Н., Цыбин О.Ю. Новая схема регистрации флуоресценции в биомолекулярных жидкостях // В сборнике: VI международная конференция по фотонике и информационной оптике. ― 2017. ― С. 456-457.
4. Савченко Е.А., Непомнящая Э.К., Дюбо Д.Б., Величко Е.Н., Цыбин О.Ю Изучение флуоресценции белков с использованием pin-фотодиода // В сборнике: Неделя науки СПбПУ Материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. ― 2016. ― С. 201-204.
5. Ambrose W, Goodwin P, Nolan J. Single-molecule detection with TIRF: comparing signal to background in different geometries / Cytometry.: ― 1999, 36(3), ―P. 224.
6. N. J. Harrick, Internal Reflection Spectroscopy. ― New York: Interscience, 1967- 334 p.

Тезисы публикуются впервые.

Савченко Е.А. 10.11.2017 

Кузнецова О.Б. 10.11.2017 

Аксенов Е.Т. 10.11.2017 