

Однофотонный счет при люминесцентном анализе с микро- и миллисекундными временами затухания*

© Д.А. Онищук, П.С. Парфенов

Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: onishchuk.dmitry@gmail.com

Поступила в редакцию 15.02.2018 г.

Рассмотрены основные методы счета фотонов, а также особенности регистрации микро- и миллисекундных времен затухания с помощью однофотонного стробируемого лавинного фотодиода. Определено влияние уровня фонового излучения на линейность счета и продемонстрирован эффект наложения фотонов при асинхронном счете, также даются рекомендации для регистрации долгоживущей или задержанной флуоресценции и фосфоресценции.

DOI: 10.21883/OS.2018.07.46281.61-18

Введение

Время затухания флуоресценции большинства объектов обычно составляет несколько десятков наносекунд, однако некоторые материалы имеют более долгие времена затухания, от микросекунд до миллисекунд, особенно в ближнем инфракрасном диапазоне. К этим материалам в основном относятся неорганические флуорофоры, такие как квантовые точки, люминофоры с апконверсией, пористый кремний, перовскиты, синглетный кислород, органические флуорофоры, такие как цианины, скуариновые и бор-дипиррометеновые красители, а также комплексы лантанидов [1]. Некоторые из этих материалов используются в исследованиях *in vivo*, биологическая визуализация долгоживущей флуоресценции этих материалов позволяет получать изображения с временным разрешением [2]. Также известно, что наиболее чувствительным методом обнаружения сигналов низкой интенсивности является счет отдельных фотонов, особенности применения которого и рассматриваются в настоящей работе.

Методы счета фотонов

Основными режимами счета фотонов являются гейтированный, многоканальный и время-коррелированный (рис. 1) [3].

При время-коррелированном счете подсчитывается только один фотон, зарегистрированный детектором после импульса возбуждения. Такой способ обеспечивает наиболее точное измерение времени среди этих методов, до нескольких пикосекунд. Для получения полной формы сигнала необходимо многократное повторение эксперимента.

* The 1st International School-conference for young researchers „Smart nanosystems for translation medicine“, November 28–29, 2017, St. Petersburg, Russia.

В гейтированном режиме счетчик включается на определенный временной интервал (гейт или строб), в течение которого производится подсчет всех импульсов, амплитуда которых больше определенного уровня. Повторение измерения с разной величиной задержки позволяет получить временную форму сигнала. Время прихода отдельных импульсов не регистрируется, а подсчитывает их количество внутри интервала. Поэтому основное применение метода — это выделение части фотонов из общего количества излученных. Например, отделение фотонов люминесценции от рассеяния, либо фосфоресценции от флуоресценции.

Многоканальный счет можно представить как счет с помощью множества гейтированных счетчиков, при котором детектируемые фотоны подсчитываются по времени прибытия в разных ячейках памяти. Временное распределение в таком случае может быть получено сразу. Для измерения больших времен можно использовать время-коррелированный счет внутри коротких интервалов с последующим „сшиванием“, но при возможности лучше использовать гейтированный и многоканальный режимы, поскольку они обеспечивают многофотонный счет в отличие от время-коррелированного и проще в реализации.

Традиционно применяемые для счета фотонов фотоэлектронные умножители (ФЭУ), а также обычные однофотонные лавинные фотодиоды (ЛФД), работающие в свободном режиме, готовы к работе каждый раз спустя определенный интервал времени после регистрации фотона. В первом случае интервал определяется собственными параметрами ФЭУ, во втором — параметрами ЛФД и схемы гашения лавинного тока, отключающей ЛФД на определенное время. Также существуют ЛФД со стробированием, позволяющим включать и выключать ЛФД в нужные интервалы времени. Кроме того, стробирование позволяет регулировать чувствительность ЛФД, обеспечивает больший динамический диапазон и меньший шум.

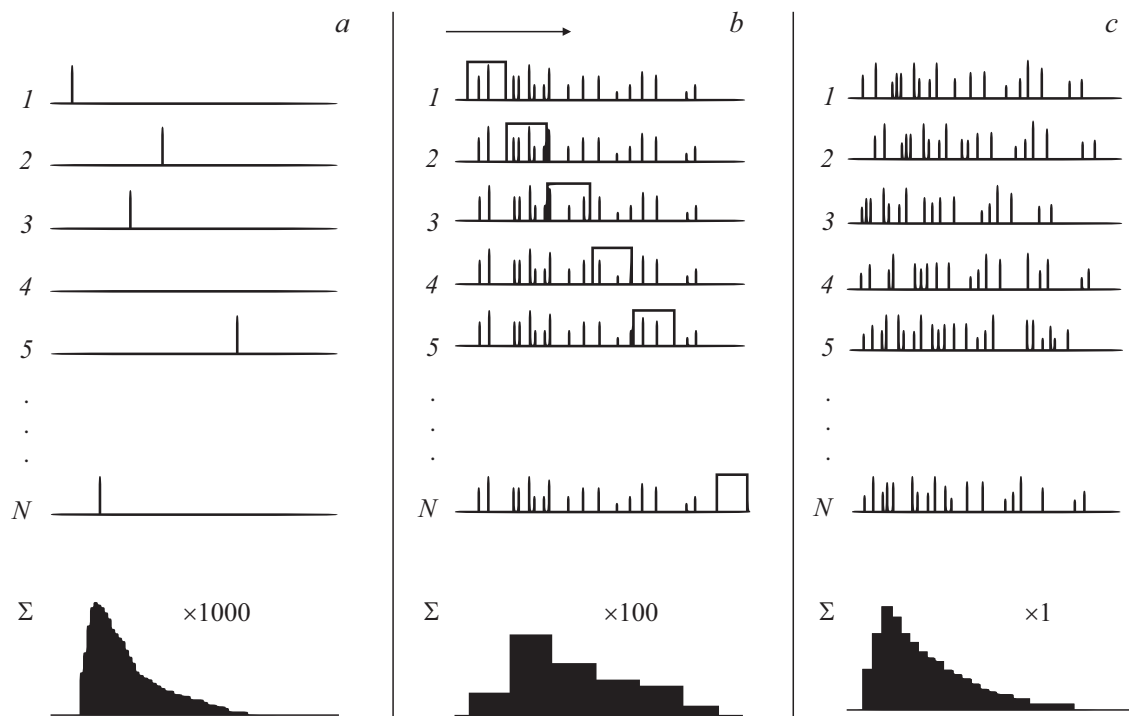


Рис. 1. Режимы счета фотонов: (а) время-коррелированный счет, (б) гейтированный счет, (с) многоканальный счет [3].

Для регистрации долгоживущей люминесценции при исследовании биологических объектов стробируемые ЛФД оказываются наилучшим выбором благодаря возможности их быстрого включения и выключения с помощью цифровых импульсов. Это позволяет отделить фотоны высокоинтенсивной короткоживущей собственной флуоресценции, которая присуща почти всем биологическим объектам, от долгоживущей задержанной флуоресценции и фосфоресценции. Без отделения интенсивной короткоживущей флуоресценции детектор часто попадает в состояния насыщения из-за первого пика и оказывается неспособным регистрировать долгоживущий сигнал. Особенно это характерно для ФЭУ. Стробирование ЛФД синхронно с импульсом возбуждения позволяет отключать детектор на определенное время, после чего проводить регистрацию фосфоресценции, а также задержанной люминесценции, подсчитывая общее количество фотонов или анализируя их распределение по времени.

При измерении длинных времен наилучшие результаты достигаются при синхронизации стробируемого ЛФД с импульсами возбуждения, что может быть организовано через делитель частоты. В этом случае частота следования стробов должна быть минимум в 100 раз выше частоты импульсов возбуждения. Также возможна работа в асинхронном режиме, при котором ЛФД запускается от собственного генератора. При этом увеличивается время измерения, но не требуется подключение дополнительного оборудования, поэтому работа проведена именно в этом режиме.

Экспериментальные результаты

В настоящей работе использовался InGaAs/InP лавинный фотодетектор фирмы Micro Photon Devices, предназначенный для обнаружения одиночных фотонов в ближнем ИК диапазоне от 900 до 1700 nm. Для счета фотонов использовалась плата DPC-230 компании Becker & Hickl, позволяющая регистрировать сигналы длительностью до нескольких миллисекунд. В качестве источника возбуждающего излучения использовались импульсные лазеры нескольких типов.

Известно, что насыщение приемника приводит к нелинейности его чувствительности из-за наложения фотонов. При измерении интенсивности или спектров наложение фотонов не искажает результат, но приводит к насыщению приемника, что ведет к ухудшению соотношения сигнал/шум. В нашем случае приемник характеризовался высокой скоростью темнового счета (10000 s^{-1}) и большим значением времени отключения после импульса ($15 \mu\text{s}$), что составляет 15% от максимальной скорости счета, при том, что нелинейность отмечается уже при уровне выше 10% [4]. Было обнаружено, что при регистрации единичного импульса, сопоставимого с уровнем фона, повышение фона вдвое еще не меняло уровень сигнала, но учетверение фона снижало соотношение сигнал/фон примерно в 100 раз (рис. 2). Поэтому при работе с однофотонными приемниками следует уделять большое внимание уровню фоновой засветки. Такие уровни шума нехарактерны для ЛФД видимого диапазона, для которых он составляет

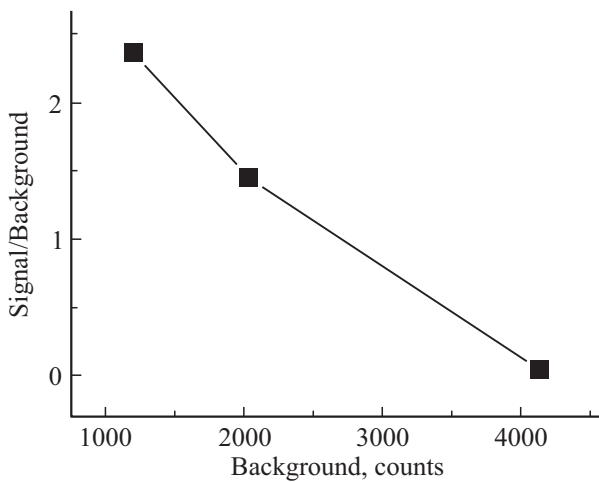


Рис. 2. Влияние фонового излучения на соотношение сигнал/шум при измерении слабого сигнала. Учетверение фона уменьшило соотношение сигнал/фон примерно в 100 раз.

меньше 100 s^{-1} при периоде отключения длительностью десятки наносекунд, но принцип остается прежним.

При большой интенсивности пика флуоресценции возможно наложение фотонов внутри одного интервала детектирования, что приводит к эффекту, известному как Pile-Up, из-за которого при время-коррелированном счете скорость счета ограничена 1–5% от максимума. В асинхронном режиме работы этот эффект проявляется необычным образом, что связано с большими значениями времени отключения приемника и равномерным следованием стробов (в отличие от случайного распределения фотонов при время-коррелированном счете). Во-первых, он проявляется при попадании лазерного излучения на приемник в полосу его чувствительности или очень короткой фоновой флуоресценции. Тогда после первого импульса большой амплитуды возникают подобные, но много меньшие по масштабу пики отрицательной направленности внутри периода отключения и положительной — после окончания этого периода. Интервал между ними кратен периоду следования стробирующих импульсов (рис. 3).

Во втором случае при регистрации интенсивной долгоживущей люминесценции наблюдается занижение уровня сигнала с последующим всплеском в точности через период отключения после начального пика люминесценции (рис. 4). Всплеск вызван окончанием периода пониженной вероятности регистрации импульсов и восстановлением способности приемника к регистрации импульсов. Поскольку понижается вероятность регистрации даже темновых импульсов, то кривая распределения в течение периода отключения может опуститься ниже фонового уровня, а времена затухания, полученные по данным из этого периода, будут занижены.

Нарушение распределения фотонов, показанное на рис. 3, связано с тем, что при попадании высокоинтенсивного импульса в один из периодов стробирования

время T_{on} существенно падает вероятность обнаружения импульсов в последующих периодах до окончания времени задержки. Но поскольку стробирующие импульсы не синхронизированы с импульсами возбуждения, то высокоинтенсивный пик попадает не во все периоды стробирования, и общая форма кривой затухания частично сохраняется.

Для предотвращения этого эффекта в первую очередь надо бороться с проникновением лазерного излучения на приемник. Далее надо уменьшать интенсивность излучения или уменьшать период стробирования фотодиода. В случае лазерного излучения последнее менее эффективно, так как длительность лазерных импульсов обычно не превышает нескольких ns. Это пример слу-

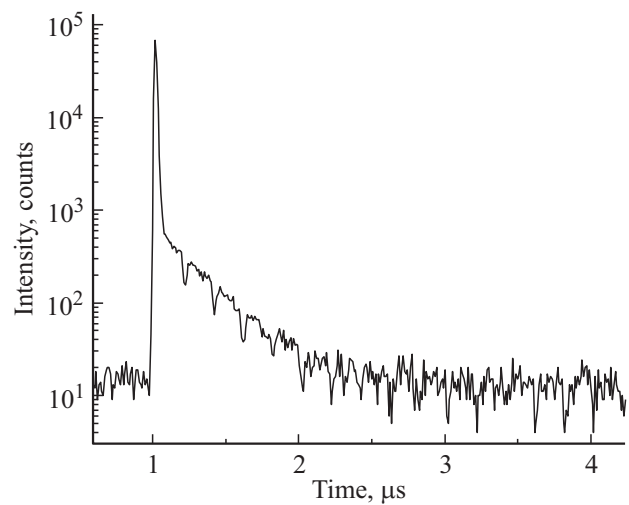


Рис. 3. Искажения кривой затухания люминесценции, вызванные высокой интенсивностью лазерного рассеянного излучения.

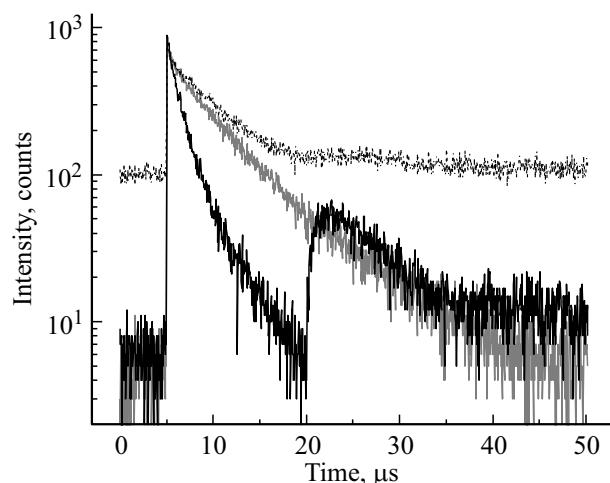


Рис. 4. Искажение кривой затухания люминесценции кремниевых нанонитей, вызванное высокой интенсивностью сигнала и длительным временем отключения. Черная линия: высокая интенсивность, частота стробирования 20 МГц; серая линия: высокая интенсивность, частота 2 МГц; штриховая линия: интенсивность понижена в 20 раз, частота 2 МГц.

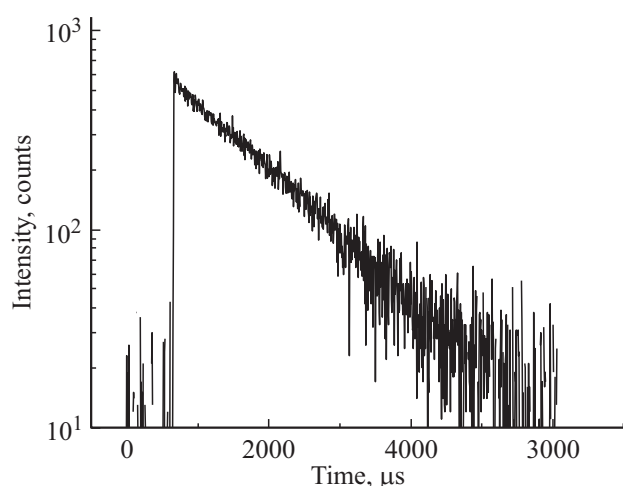


Рис. 5. Кривая затухания люминесценции КТ РbS диаметром 3.3 nm, постоянная времени 1.37 μ s.

чая, когда синхронный режим работы фотоприемника имел бы существенные преимущества, так как позволил бы регистрировать сигнал со сдвигом относительно импульса.

Для предотвращения занижения числа регистрируемых фотонов в период отключения приемника (рис. 4) необходимо, чтобы во время этого периода регистрировалось не более одного фотона. Это происходит, если вероятность их регистрации не превышает 1–5%. Простое понижение интенсивности ухудшит соотношение сигнал/шум, как показано на рис. 4, в то время как сохранить его можно, понизив частоту следования стробов. При этом необязательно ее понижать до уровня 1–5% от величины, обратной периоду отключения. На практике устраивает гораздо большая частота следования стробов. Так, на рис. 4 видно, что понижение частоты следования в 10 раз до 2 МГц практически восстановило форму кривой.

В качестве примера кривых затухания, полученных асинхронным методом при оптимальных параметрах, можно представить кривые затухания люминесценции раствора квантовых точек сульфида свинца диаметром 3.3 nm с пиком люминесценции на 1190 nm (рис. 5). Постоянная времени затухания составила 1.37 μ s.

Приборы для многоканального счета позволяют анализировать времена длительностью до нескольких секунд. При анализе задержанной флуоресценции, если временные параметры сигнала известны заранее, более простым может быть использование гейтированного счета, когда подсчитывается общее число фотонов в период, соответствующий основной флуоресценции (с задержкой от пика быстрой флуоресценции). При этом можно дополнительно учитывать фон, если подсчитывать импульсы в равном интервале между люминесценцией и следующим импульсом возбуждения и вычитать их из числа импульсов, подсчитанных в период люминесценции.

Заключение

Для регистрации микро- и миллисекундных времен люминесценции наиболее подходят многоканальный и гейтированный режимы, при этом первый режим позволяет строить кривые затухания, а второй достаточен для регистрации интенсивности красителей с известным временем затухания. В качестве оптимального приемника для регистрации долгоживущей флуоресценции и фосфоресценции наибольшую гибкость обеспечивают стробируемые однофотонные ЛФД. Стробирование позволяет кратковременно отключать приемник, избегая его насыщения, а также обеспечивает больший динамический диапазон. При работе с такими приемниками в ближнем ИК диапазоне существенное влияние оказывает большой темновой шум и длительные времена отключения приемника.

Работа выполнена при государственной поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 08-08).

Список литературы

- [1] *Pansare V.J. et al.* // Chem. Mater. 2012. V. 24. P. 812. doi 10.1021/cm2028367
- [2] *Kabe R., Adachi C.* // Nature. 2017. V. 550. P. 384. doi 10.1038/nature24010
- [3] *Jiménez-Banzo A. et al.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P. 1003. doi 10.1039/b804333g
- [4] *Becker W.* TCSPC Handbook. Berlin: Becker & Hickl. 2014.