

Я. С. ПОЛЯКОВ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МИКРОСКОПА ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

(Представлено академиком В. П. Линником 15 VII 1970)

До настоящего времени люминесцентные микроскопы использовались в основном для локальных исследований, т. е. в тех случаях, когда исследуемый объект имеет в принципе малые размеры. Для определения же параметров люминесценции таких объектов как растворы и кристаллы применяются надежные и привычные макроустановки. Весьма распространено представление о том, что само использование микроскопа для исследования люминесценции предопределяет чрезвычайно низкий уровень, доходящей до фотоприемника энергии, что связано с малыми размерами фотометрируемого участка.

Однако более детальное рассмотрение этого вопроса привело нас к другим выводам.

Рассмотрим блок-схемы макроустановки для исследования люминесценции и установки с люминесцентным микроскопом (рис. 1А). На обоих рисунках 1 — источник возбуждающей энергии; 2 — осветительная система, фокусирующая энергию возбуждения на объект; 3 — ячейка с исследуемым объемом (в случае макроустановки это может быть кювета с раствором, в случае микроскопа — микрокювета); 4 — оптическая система регистрации, собирающая поток люминесценции на входную щель монохроматора или спектрографа 5; 6 — фотоприемник. На рис. 1Б системой регистрации 4 является оптика люминесцентного микроскопа. Мы рассматриваем случай освещения объекта «сверху» через объектив микроскопа с помощью опак-иллюминатора.

Целесообразность использования такого способа освещения в люминесцентной микроскопии при работе с высокоапертурными объективами была обоснована Брумбергом (1). В опак-иллюминаторе используются сменные интерференционные светоделительные пластинки (на рис. 1Б светоделительная пластинка обозначена пуктиром), идея применения которых для люминесцентного микроскопа также принадлежит Брумбергу (2). Такие пластинки характеризуются высоким коэффициентом отражения для коротковолновых лучей, возбуждающих люминесценцию, и высоким коэффициентом пропускания для более длинноволновых лучей люминесценции.

Будем считать, что в обоих рассматриваемых вариантах используется один и тот же спектральный прибор 5, фотоприемник 6 и источники возбуждающего света одинаковой яркости.

Величина энергии, достигшей фотоприемника, определяется выражением:

$$W = \pi B_{\pi} \tau_p l^2 \sin^2 U = \pi B_{\pi} \tau_p L^2, \quad (1)$$

где B_2 — яркость люминесценции; τ_p — пропускание системы регистрации 4 и монохроматора 5, $L = l \sin U$ — величина, определяемая из закона синусов Аббе и являющаяся постоянной для данной оптической системы.

В общем случае значения L для систем 4 и 5 являются различными. Определяющим энергетикой всей системы является наименьшее из этих значений. Вообще говоря, фотоприемник также характеризуется некоторой величиной L , но для него она почти всегда велика. Например, в случае фотоумножителя с диаметром фотокатода 10 мм значение L близко к 10. Поэтому необходимо сравнить значения L для систем 4 и 5.

Отечественной промышленностью выпускаются монохроматоры и спектрографы для ультрафиолетовой и видимой области спектра, характеризующиеся различными значениями относительного отверстия ⁽³⁾. Максимальное значение относительного отверстия 1:2, 3. Это соответствует $\sin U \cong 0,21$. Пусть при этом желаемая ширина выделяемого спектрального интервала составляет ~ 4 мμ, обратная линейная дисперсия в плоскости входной щели $d\lambda/dl = 2$ мμ/мм и входная щель изображается в выходную с увеличением $|v| = 1 \times$. Тогда $l_{\text{вх}} = l_{\text{вых}} = 1$ мм и $L_5 = 0,21$. Заметим, что ужесточение требований к ширине выделяемого спектрального интервала приводит к уменьшению величины L .

При использовании микрообъектива $50 \times 0,65$ поле зрения микроскопа в плоскости объекта $l \cong 0,3$ и $L_4 = 0,3 \cdot 0,65 \cong 0,2$.

Из сравнения величин L для микроскопа и монохроматора следует, что по этому параметру микроскоп практически не накладывает ограничений на величину энергии, попадающей на фотоприемник. Кроме того, при необходимости значение L может быть увеличено посредством использования микрообъективов с малым увеличением и большой апертурой. Например, для микрообъектива $20 \times 0,40$ величина L равна 0,3.

Теперь рассмотрим вопрос о яркости люминесценции. В случае исследования объектов с высоким показателем поглощения яркость люминесценции пропорциональна освещенности объекта возбуждающими лучами. Величина освещенности выражается следующим образом:

$$E = \pi B \tau_{\text{осв}} \sin^2 U_{\text{осв}}, \quad (2)$$

где B — яркость источника, $\tau_{\text{осв}}$ — пропускание осветительной системы и $U_{\text{осв}}$ — апертурный угол системы освещения в пространстве объекта. В случае использования микроскопа при освещении объекта через микрообъектив апертура возбуждения, естественно, равна апертуре регистрации.

При исследовании люминесценции с помощью макроустановок апертурный угол $U_{\text{осв}}$ по необходимости имеет весьма малые значения, в особенности в тех случаях, когда направление регистрации люминесценции составляет прямой угол с направлением возбуждающего пучка. При этом необходимо возбудить люминесценцию объекта более или менее равномерно по толщине, что приводит к необходимости еще более ограничить апертуру возбуждающего пучка и в случае сильно поглощающих объектов использовать растворы малой концентрации.

Если принять для макроустановки относительное отверстие осветительной системы равным 1:10, то при одинаковой доле световых потерь яркость люминесценции при использовании микрообъектива $50 \times 0,65$ более чем в 100 раз превышает яркость люминесценции, полученную с помощью макроустановки. В действительности это соотношение окажется не таким большим из-за более низкого по сравнению с макроустановкой пропускания оптической системы микроскопа как в ветви возбуждения, так и в ветви регистрации. Светопропускание микрообъектива $50 \times 0,65$ в области 260—300 мμ, используемой для возбуждения люминесценции многих органических объектов, составляет примерно 55—60% и повышается с увеличением длины волны ⁽⁴⁾. Следовательно, пропускание всей оптической системы микроскопа должно быть не меньше 35—40%.

Исходя из формул (1) и (2), напишем выражение для величины K , равной отношению энергии W_1 , достигшей фотоприемника в установке с люминесцентным микроскопом, к энергии W_2 , достигшей фотоприемника в макроустановке

$$K = \frac{W_1}{W_2} = \frac{B_{\lambda 1} \tau_{p1}}{B_{\lambda 2} \tau_{p2}} = \frac{\sin^2 U_{\text{осв1}} \tau_{\text{осв1}} \tau_{p1}}{\sin^2 U_{\text{осв2}} \tau_{\text{осв2}} \tau_{p2}}. \quad (3)$$

В рассматриваемом нами примере $K \cong 17$, т. е. при использовании люминесцентного микроскопа величина регистрируемой энергии значительно (в 17 раз) больше.

Подведем итог изложенному. Тот факт, что с помощью микроскопа фотометрируются малые участки объекта, сам по себе не приводит к низким уровням регистрируемой энергии, так как малый размер участка по меньшей мере компенсируется большим телесным углом, в пределах которого воспринимается излучение объекта. Что же касается яркости люминесценции, то в люминесцентном микроскопе она может оказаться на один — два порядка выше, чем в макроустановках.

При переходе к объектам с меньшими показателями поглощения преимущество люминесцентного микроскопа будет постепенно уменьшаться, так как яркость люминесценции будет определяться не только поверхностным, но и более глубоко лежащими слоями. По-видимому, можно получить строгое выражение, связывающее величину регистрируемой энергии с пропусканием системы и показателем поглощения объекта. Из этого выражения следовало бы, в каких границах применение люминесцентного микроскопа более целесообразно. Но уже сейчас ясно, что люминесцентный микроскоп является не только орудием биологических и биофизических исследований, но и весьма тонким и полезным инструментом для решения чисто физических задач.

В заключение автор выражает глубокую благодарность Е. М. Брумбергу и Л. С. Агроскину за полезное обсуждение работы.

Поступило
18 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. М. Брумберг, Журн. общ. биол., 16, 3, 222 (1955). ² Е. М. Брумберг, Т. Н. Крылова, Журн. общ. биол., 14, 6, 461 (1953). ³ К. И. Тарасов, Спектральные приборы, Л., 1968, стр. 147, 243. ⁴ Р. М. Ларина, Л. С. Агроскин, Опт.-механич. пром., № 12, 6 (1966).