

УДК 520.35

© В. Г. Кривенко, Ю. Л. Ходасевич, С. Н. Пантуз, В. И. Емельяненко,
Н. И. Борисова, Е. А. Пермяков, 2021

СКОРОСТНОЙ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТР СФЛ-С

В Институте биологического приборостроения РАН разработан экспериментальный многофункциональный скоростной спектрофлуориметр СФЛ-С. Спектрофлуориметр предназначен для измерения спектров возбуждения и излучения растворов и суспензий биологических молекул и клеток в ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной областях спектра в ходе проведения фундаментальных и прикладных исследований в области физико-химической и клеточной биологии, биофизики, биохимии и медицины. Особенности прибора являются: возможность скоростной регистрации спектров с помощью многоканальной регистрирующей системы (32 канала, более 20 спектров в секунду), возможность управления изменением температуры исследуемого раствора по заданному алгоритму (от 0 до 100 °С), а также возможность осуществления микротитрования исследуемого раствора в кювете прибора с помощью автоматизированного микродозатора.

Кл. сл.: спектрофлуориметр, спектр, люминесценция, флуоресценция, возбуждение, скоростные измерения

ВВЕДЕНИЕ

Метод люминесценции (флуоресценции) уже давно является широко распространенным спектральным методом, применяющимся в различных областях физики, химии и биологии. Особенно широкое применение этот метод нашел в физико-химической биологии, биофизике, биохимии и отчасти в медицине [1–3]. Многие органические молекулы содержат сопряженные двойные связи, способные поглощать кванты света в ультрафиолетовом и видимом спектральных диапазонах, а затем излучать кванты света с более низкой энергией (фотолюминесценция). Параметры излучения (положение максимума спектра, квантовый выход излучения и т.д.) зависят от свойств ближайшего окружения излучающей молекулы, что можно использовать для различных целей. Например, широко известно использование естественных и искусственных флуоресцентных зондов и меток для исследования биополимеров — белков и нуклеиновых кислот [1–3].

Для измерения спектров излучения и возбуждения различных соединений используют специальные приборы, называемые спектрофлуориметрами. Обычно спектрофлуориметр для измерения стационарных спектров состоит из источника возбуждающего света, монохроматора возбуждающего света, ячейки для исследуемого образца, системы сбора света с образца, анализирующего монохроматора, фотоэлектронного умножителя и системы регистрации и анализа спектра излучения [1–3]. Ведущие зарубежные фирмы-изготовители

спектрофлуориметров, такие как Horiba, PerkinElmer, Thermo, Shimadzu, Hitachi, выпускают преимущественно приборы для измерения стационарной флуоресценции, непрерывно обновляя и развивая семейства выпускаемых ими приборов. В приборах используются современные элементы микроэлектронной техники, новые материалы и перспективные конструкторские решения (см., например, [4, 5]). В нашей стране спектрофлуориметры, пригодные для изучения биологических объектов, не выпускаются. В Институте биологического приборостроения РАН были проведены работы по поиску технических решений, позволяющих разработать достаточно дешевый универсальный спектрофлуориметр, способный быстро измерять спектры излучения биологических объектов в широком диапазоне температур и пригодный для проведения титрования исследуемого жидкого образца малыми добавками различных соединений.

УСТРОЙСТВО ПРИБОРА

Спектрофлуориметр СФЛ-С, общий вид которого представлен на рис. 1, построен по классической схеме регистрации, когда излучение изучаемого образца собирается под углом 90° по отношению к направлению пучка возбуждающего света. При этом возбуждающий поток формируется монохроматизацией непрерывного спектра излучения ксеноновой лампы XBO 150W/GROFR фирмы OSRAM.

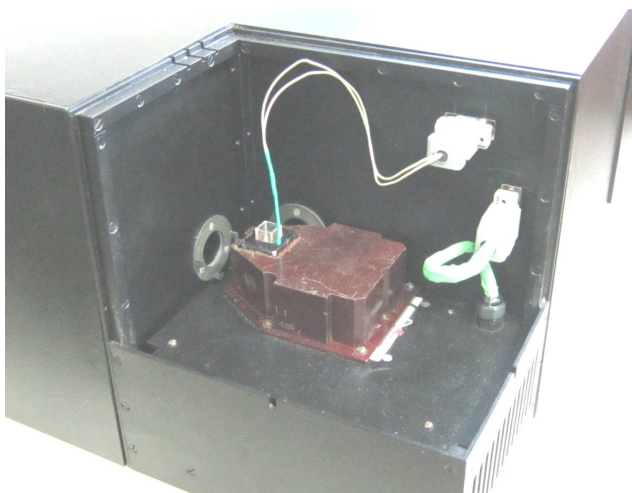


Рис. 1. Общий вид спектрофлуориметра СФЛ-С с открытой кюветной камерой

В состав спектрофлуориметра СФЛ-С входят спектрофлуориметрический блок, титрационное устройство, приставка для быстрого смешения растворов и управляющий компьютер. Спектрофлуориметрический блок объединяет оптико-механическую систему прибора и электронные средства, обеспечивающие процесс управления спектрофлуориметром.

На рис. 2 приведена упрощенная блок-схема спектрофлуориметрического блока СФЛ-С. Этот блок состоит из следующих функциональных узлов: источник возбуждающего света, монохроматоры возбуждения и регистрации, узел фотоэлектронного преобразователя (ФЭП) и многоканального фотоэлектронного преобразователя (МФЭП), кюветное отделение, источники питания лампы, силовых, аналоговых и цифровых цепей, платы контроллера и измерения, программируемый термостат, плата контроллера многоканального ФЭУ, средства вентиляции спектрофлуориметрического блока.

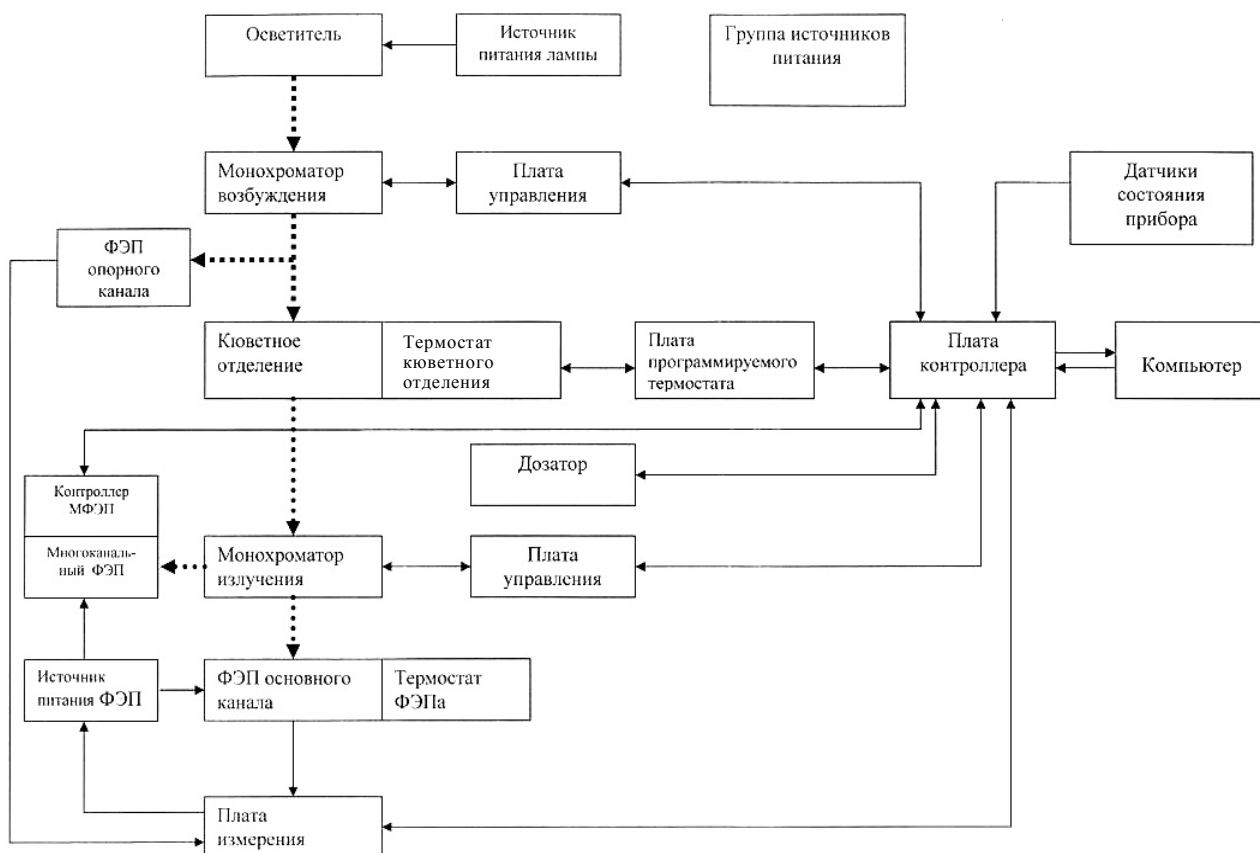


Рис. 2. Упрощенная блок-схема спектрофлуориметра СФЛ-С

В монохроматорах возбуждения и регистрации использованы вогнутые голографические дифракционные решетки с числом штрихов 1200 на мм, радиусом 150 мм и рабочей спектральной областью 200–900 нм, обеспечивающие высокое пропускание и низкий уровень рассеянного света. Монохроматоры выполнены в виде самостоятельных конструктивных сборок, включающих в себя как оптические и механические элементы, так и электронные модули, обеспечивающие работу этих узлов.

Для обеспечения равномерной перестройки монохроматора по длинам волн в процессе сканирования и, соответственно, для линейности шкалы прибора по оси длин волн измеряемого спектра использовали синусный механизм и цифровой микроконтроллер, управляющий шаговым двигателем привода дифракционной решетки. Для регистрации стационарных спектров излучения с механической разверткой использовали фотоумножитель R6356 фирмы Hamamatsu, имеющий высокую чувствительность детектирования в области 185–900 нм и минимальный темновой ток на уровне 0.1 нА при номинальном усилении.

Важнейшей особенностью спектрофлуориметра является возможность введения в канал регистрации излучения исследуемого образца многоканального приемного устройства в виде 32-канального фотоумножителя H7260 фирмы Hamamatsu для быстрой регистрации спектров.

Для исследования взаимодействий различных соединений друг с другом нами разработан дозатор, способный по заданной программе добавлять в измерительную ячейку малые объемы растворов различных веществ. Дозирование реагентов в дозаторе обеспечивается путем пошагового перемещения плунжера прецизионного микрошприца. Конструкция дозатора рассчитана на использование микрошприцев фирмы Hamilton серии 1700, исполнения N или TLL. Возможно применение микрошприцев других производителей, имеющих аналогичные конструктивные характеристики. Шаговый привод дозатора обеспечивает перемещение плунжера микрошприца не менее чем на 50 мкм. При этом минимальное перемещение плунжера микрошприца (единичный шаг) составляет 6.3 мкм, а время выполнения дозатором этого перемещения составляет не более 2 мс.

Для осуществления возможности быстрого смешения растворов в измерительной ячейке мы использовали приставку быстрого смешивания RX2000 (AppliedPhotophysics). Минимальные объемы смешивания составляют 0.3 мл. Смешивание образцов производится пневматически, мертвое время порядка 6 мс. Необходимая температура образцов в шприцах и кювете обеспечивается с помощью внешнего водяного термостата.

СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ ПРИБОРОМ

Верхний уровень управления

Система управления спектрофлуориметром СФЛ-С включает в себя три уровня. Верхний уровень, представляющий из себя управляющий компьютер прибора, обеспечивает общее управление спектрофлуориметром. Через диалоговые окна монитора компьютера можно выбрать режим измерений, ввести уставки выбранного режима, запустить процесс измерения и представления результатов. В процессе измерений программное обеспечение верхнего уровня формирует набор управляющих команд, соответствующих выбранному режиму измерений, поддерживает получение потока информации в процессе измерений, производит необходимую математическую обработку полученных массивов. После завершения цикла измерений осуществляется сохранение результатов в выбранной форме.

Второй уровень управления

Роль второго уровня управления прибором осуществляет плата контроллера спектрофлуориметрического блока, выполненная на 8-битном AVR микроконтроллере ATmega128-16AU фирмы Atmel с улучшенной RISC архитектурой, имеющей 53 входа/выхода и 128 кбайт программируемой памяти. В задачи второго уровня входит: обеспечение обмена данными с верхним уровнем управления, управление процессом инициализации устройств спектрофлуориметрического блока и микротитратора, поддержание циклических процессов измерения интенсивности по основному и опорному каналам, контроль температуры кюветодержателя и непосредственно исследуемого образца с помощью датчиков температуры, поддержание процесса измерения в установленном режиме в соответствии с уставками, определенными для данного режима системой управления верхнего уровня.

Третий уровень управления

Роль третьего уровня управления спектрофлуориметром выполняют 8-битные AVR микроконтроллеры ATmega8-16AU фирмы Atmel, имеющие 23 входа/выхода и 8 кбайт программируемой памяти, установленные на платах управления функциональных узлов спектрофлуориметрического блока. Роль этого уровня управления заключается в управлении драйверами исполнительных механизмов функциональных узлов, что разгружает контроллер фотометрического блока от рутинных процедур. Кроме того, контроллеры таких устройств, как плата контроллера многоканального ФЭУ и программируемый термостат кюветного

отделения, обеспечивают автономное управление процессами на уровне этих узлов.

Пользовательский интерфейс

Управление спектрофлуориметром запускается программой SFL1.exe. На мониторе открывается главное окно программы. На рис. 3 приведен пример окна программы с установленными режимом, уставками и результатами измерений. Условия измерений задаются выбором в меню необходимого режима и подрежима. На главной панели уставок, расположенной в верхней части рабочего окна, производится установка монохроматоров на заданные длины волн, установка щелей монохроматоров, установка спектрального интервала монохроматоров, шага сканирования и времени накопления точек спектра, установка напряжения, питающего ФЭУ, и коэффициентов усиления регистрирующего тракта, установка температуры измерения. В нижней строке состояния рабочего окна программы можно контролировать уровень интенсивности флуоресценции, регистрируемой измерительным трактом спектрофлуориметра.

На главной панели уставок производится также установка постоянной времени регистрирующего тракта, скорости перемешивания магнитной мешалки в кюветодержателе, количество повторов и форма представления результатов измерения в режиме точечных измерений. Сигнал ФЭУ выводится в цифровой и гистограммной формах.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИБОРА

- Рабочий спектральный диапазон канала возбуждения 220–800 нм, канала регистрации 240–900 нм. Погрешность установки длин волн монохроматоров не превышает ± 1 нм.
- Выделяемый спектральный интервал монохроматоров обоих каналов имеет фиксированные значения 1, 2, 5, 10 и 20 нм.
- Шаг сканирования в режиме механической развертки спектра имеет значения 0.2, 1.0, 2.0 и 5.0 нм.
- Время накопления точек спектра: 0.04, 0.2, 1.0 и 5.0 с.

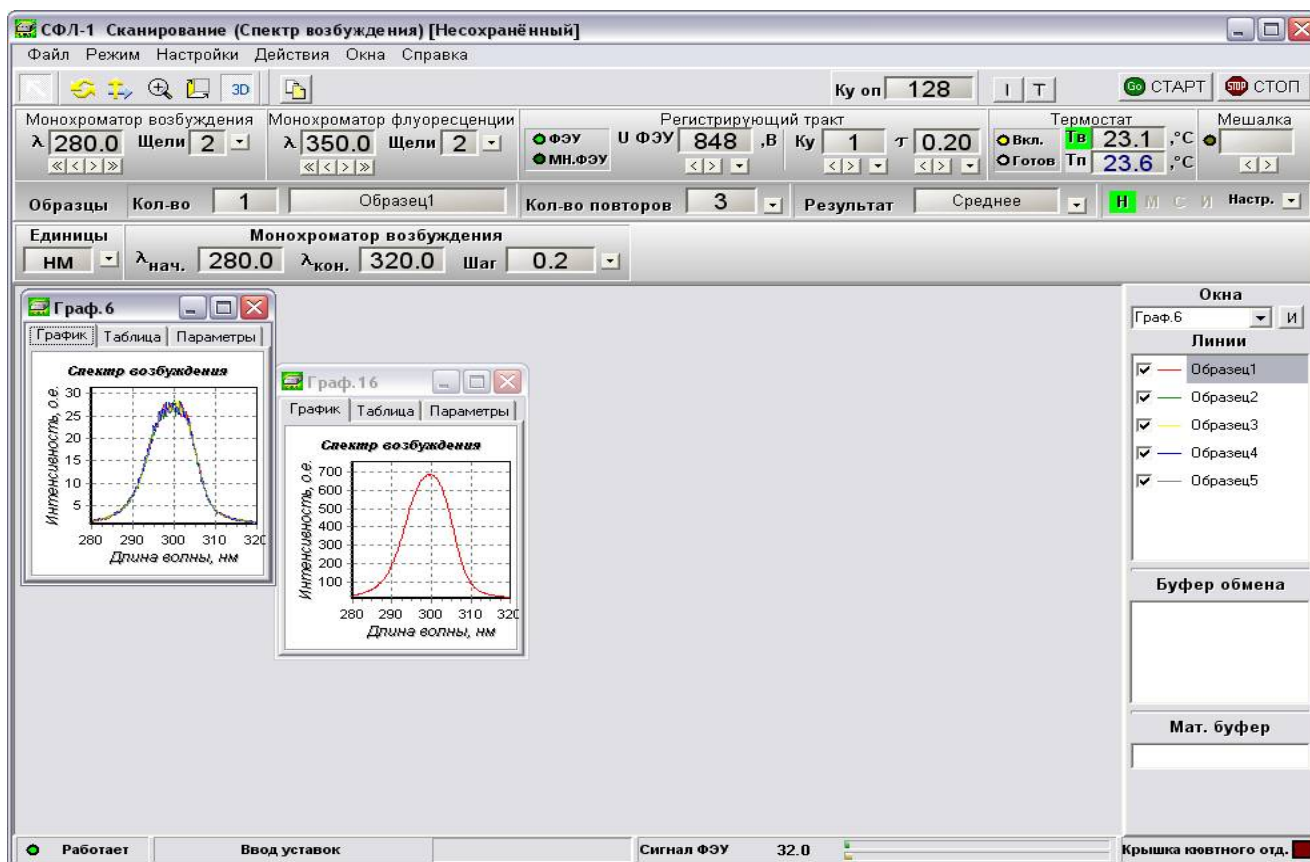


Рис. 3. Главное окно программы с выводом результатов измерений

➤ Минимальное время между последовательной регистрацией двух спектров из 32 точек в режиме многоканальной регистрации 0.04 с.

➤ Соотношение сигнал-шум порядка 200 при регистрации спектра комбинационного рассеяния воды при времени накопления канала регистрации 1 с и спектральных интервалах монохроматоров обоих каналов 10 нм.

ДЕМОНСТРАЦИЯ РАБОТЫ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРА В РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ

На рис. 4 приведены спектры флуоресценции водных растворов фенилаланина (1) и флуоресцеина (2), измеренные в режиме механической развертки спектра. Спектр фенилаланина, ароматической аминокислоты, входящей в состав большинства белков, измерен при концентрации 0.08 мг/мл и напряжении на ФЭУ 800 В при возбуждении

светом с длиной волны 265 нм и спектральными щелями монохроматоров возбуждения и регистрации 5 и 2 нм соответственно. Квантовый выход флуоресценции фенилаланина в водном растворе очень невысок и составляет около 0.04 [3]. В спектре флуоресценции фенилаланина прослеживается хорошо известная колебательная структура [2, 3]. Спектр излучения флуоресцеина измерен при его предельно низкой концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл и напряжении ФЭУ 600 В, щелями монохроматоров возбуждения и регистрации 5 нм. Это показывает, что по чувствительности и спектральным характеристикам спектрофлуориметр СФЛ-С в УФ и видимой областях не уступает лучшим зарубежным приборам.

На рис. 5 представлены результаты модельного титрометрического эксперимента с применением прилагаемого к прибору автоматизированного дозатора.

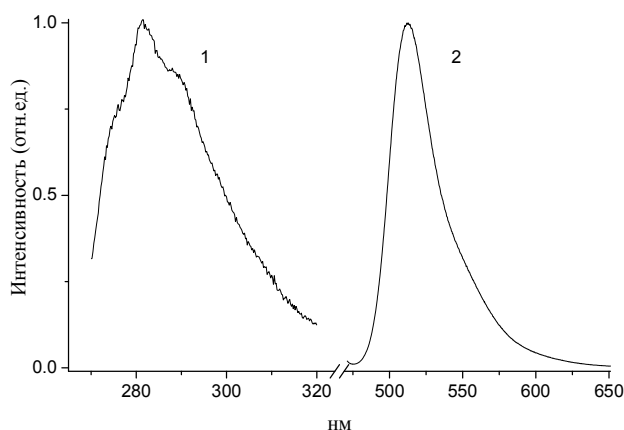


Рис. 4. Спектры флуоресценции водных растворов фенилаланина (1) и флуоресцеина (2).

Условия: для (1) — концентрация 0.08 мг/мл, напряжение на ФЭУ 800 В, длина волны возбуждения 265 нм, ширина спектральных щелей монохроматоров возбуждения и излучения 5 и 2 нм соответственно; для (2) — концентрация $5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл, напряжение на ФЭУ 600 В, возбуждение 460 нм, ширина спектральных щелей монохроматоров 5 нм

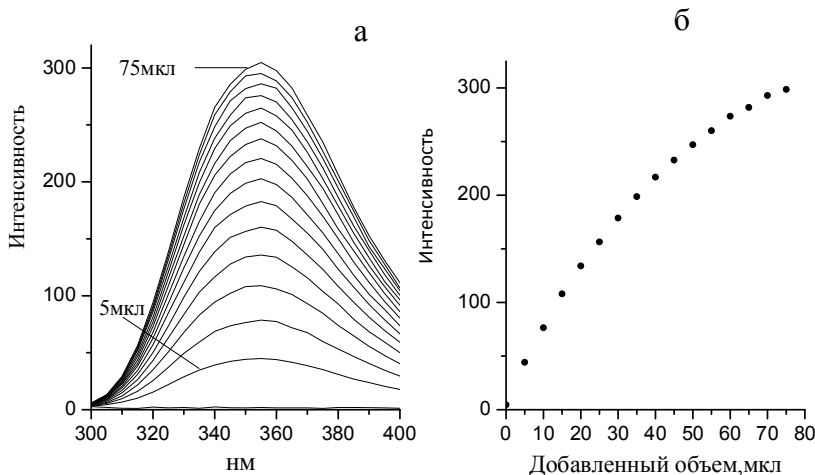


Рис. 5. Модельный эксперимент по титрованию 2 мл воды маточным раствором триптофана (концентрации 0.3 мг/мл) с помощью автоматизированного дозатора.

а — спектры флуоресценции; б — зависимость интенсивности флуоресценции триптофана при 350 нм от добавленного объема, длина волны возбуждения 280 нм, напряжение на ФЭУ 600 В

Представленные спектры флуоресценции получены при автоматическом добавлении в кювету с 2 мл воды через заданный интервал времени 5 мкл раствора триптофана, ароматической аминокислоты, содержащейся в большинстве белков, с концентрацией 0.3 мг/мл в режиме работающей магнитной мешалки. Концентрация триптофана в кювете после первой добавки составляет $0.75 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, конечная равна 0.047 мг/мл. Длина волны возбуждающего света 280 нм, длина волны регистрации 350 нм. Напряжение на ФЭУ 600 В. Щели монохроматоров 5 нм.

Для измерения температурной зависимости интенсивности флуоресценции изучаемого образца в главном меню рабочего окна необходимо выбрать пункт меню "РЕЖИМ", затем из выпадающего подменю выбрать режим "Температурная зависимость", а затем подрежим "Точечные измерения". На рис. 6 представлена зависимость интенсивности флуоресценции при 350 нм водного раствора триптофана, измеренная в режиме программируемого управления изменением температуры с шагом 2 °С.

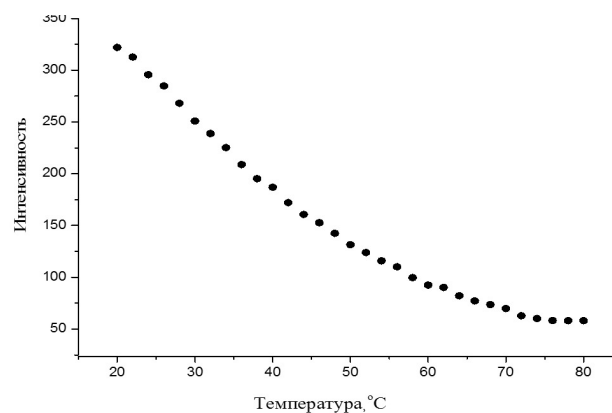


Рис. 6. Температурная зависимость интенсивности флуоресценции при 350 нм водного раствора триптофана, измеренная в режиме программируемого прогрева раствора с шагом 2 °С.

Длина волны возбуждения 280 нм. Напряжение ФЭУ 600 В, ширина спектральных щелей монохроматоров 5 нм

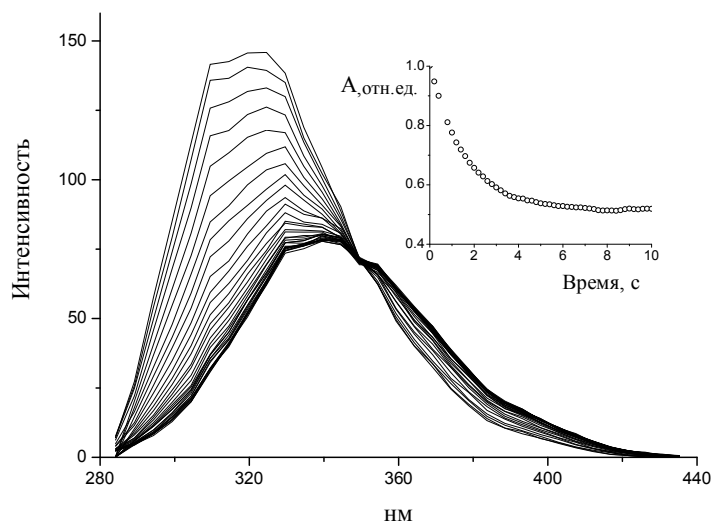


Рис. 7. Кинетика изменения спектров флуоресценции парвальбумина трески при диссоциации кальция под действием хелатора двухвалентных катионов ЭДТА.

Использована приставка быстрого смешивания RX2000 (AppliedPhotophysics) при регистрации многоканальным ФЭУ H7260 (Hamamatsu). Концентрация белка 50 мкМ, 0.05 М Hepes, pH 8.1. Длина волны возбуждения 280 нм, напряжение на ФЭУ 700 В, ширина спектральных щелей монохроматоров 5 нм. Интервал между спектрами 0.2 с. На вставке представлена кинетика изменения относительной площади A под спектрами излучения

На рис. 7 представлены результаты эксперимента по изучению кинетики диссоциации ионов кальция из кальцийсвязывающего белка — парвальбумина трески [6]. Парвальбумин трески (молекулярная масса около 12 кДа) обладает двумя сильными центрами связывания ионов кальция. Параметры флуоресценции его единственного остатка триптофана (положение максимума спектра и квантовый выход флуоресценции) сильно зависят от степени заполнения его центров связывания кальцием [7].

При быстром смешивании раствора кальцийнасыщенного парвальбумина с хелатором двухвалентных катионов ЭДТА (этилендиамин-тетрауксусная кислота) при pH 8.1 с помощью приставки быстрого смешивания RX2000 (AppliedPhotophysics Ltd, Leatherhead, UK) ионы кальция уходят с белка и переходят на хелатор. Этот быстрый процесс хорошо прослеживается по изменению спектров триптофановой флуоресценции парвальбумина при регистрации многоканальным ФЭУ H7260 (Hamamatsu, Japan)

с временем шага между последовательно измеренными спектрами 0.2 с. При удалении кальция из парвальбумина происходит длинноволновый сдвиг максимума спектра триптофановой флуоресценции почти на 30 нм и резкое падение квантового выхода флуоресценции, что соответствует перемещению его единственного остатка триптофана из внутренней части белка на его поверхность в водное окружение [2, 3, 7]. Отметим, что для изучения кинетики методом остановленного потока в современных спектрофлуориметрах обычно регистрируют излучение при одной длине волны. На вкладке рис. 7 показано изменение площади под спектрами излучения в зависимости от времени. Приведенные экспериментальные результаты позволяют измерить константы скорости диссоциации ионов кальция из центров связывания парвальбумина, что очень важно для понимания механизмов функционирования этого белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в России разработан скоростной спектрофлуориметр, который по спектрально-техническим характеристикам не уступает аналогичным приборам зарубежных фирм (см., например, [4, 5, 8, 9]).

Спектрофлуориметр СФЛ-С регистрирует спектры флуоресценции исследуемых растворов по 32 каналам (точкам спектральной кривой) одновременно со скоростью более 20 спектров в секунду. При этом оснащение прибора позволяет одновременно с многоканальной регистрацией флуоресценции осуществлять изменение температуры исследуемого образца по заранее определенному алгоритму, а также осуществлять микротитрование растворов в кювете прибора с помощью управляемого автоматизированного микродозатора. Комплексность прибора существенно расширяет возможности проведения с его помощью сложных биохимических и биофизических экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Паркер С. Фотолуминесценция растворов. М.: Мир, 1972. 510 с.
2. Permyakov E.A. Luminescent Spectroscopy of Proteins. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1993. 164 p.
3. Пермяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка. М.: Наука, 2003. 189 с.
4. RF-6000 Fluorescence Spectrofluorometer URL: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/fluorescence-spectroscopy/rf-6000.html>
5. Спектрофлуориметр FluoroLog 3. URL: <http://www.nytek.ru/catalog/spectrofluorometers/fluorolog-3/>
6. Permyakov E.A. Parvalbumin. Nova Science Publishers. New York, 2006. 196 p.
7. Permyakov E.A., Yarmolenko V.V., Emelyanenko V.I., Burstein E.A., Gerday C., Closset J. Fluorescence studies of the calcium binding to whiting (*Gadus merlangus*) parvalbumin // Eur. J. Biochem. 1980. Vol. 109, no. 1. P. 307-315.
8. Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. URL: <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/fluorescence-systems/cary-eclipse-fluorescence-spectrophotometer>
9. Fluorescence Spectrophotometer F-7100. URL: https://www.hitachi-hightech.com/global/product_detail/?pn=ana-f7100

**Институт биологического приборостроения РАН,
Московская область, г. Пушкино**

Контакты: Емельяненко Виктор Иванович,
emelyane@rambler.ru

Материал поступил в редакцию 23.03.2021

HIGH SPEED REGISTRATION SPECTROFLUORIMETER SFL-S

V. G. Krivenko, Yu. L. Khodasevich, S. N. Pantuz,
V. I. Emalyanenko, N. I. Borisova, E. A. Permyakov

*Federal Research Center 'Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences',
Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia*

An experimental multifunctional high speed registration spectrofluorimeter SFL-S has been developed at the Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences. The spectrofluorimeter is designed to measure excitation and emission spectra of solutions and suspensions of biological molecules and cells in the ultraviolet, visible, and near infrared spectral regions in the course of fundamental and applied research in the field of physicochemical biology, biophysics, biochemistry, and medicine. Features of the instrument are: the possibility of high-speed registration of spectra by means of multichannel system (32 channels, more than 20 spectra per second); the ability to control the change of the temperature of the solution in the measuring cell according to a given algorithm (0 to 100 °C); the possibility of microtitration of the solution in the measuring cell using an automatic microtitrator.

Keywords: spectrofluorimeter, spectrum, luminescence, fluorescence, excitation, high speed measurements

INTRODUCTION

The luminescence (fluorescence) method has long been a widespread spectral method used in various fields of physics, chemistry, and biology. This method is especially widely used in physicochemical biology, biophysics, biochemistry and partly in medicine [1–3]. Many organic molecules contain conjugated double bonds capable of absorbing quanta of light in the ultraviolet and visible spectral ranges, and then emit lower energy quanta of light (photoluminescence). The emission parameters (the position of the spectrum maximum, the quantum yield of emission, etc.) depend on the properties of the immediate environment of the emitting molecule, which can be used for various purposes. For example, there is a widely known usage of natural and artificial fluorescent probes and labels for the study of biopolymers — proteins and nucleic acids [1–3].

To measure the emission and excitation spectra of various compounds, special devices called spectrofluorimeters are used. Typically, a spectrofluorimeter / spectrofluorometer for measuring stationary spectra consists of an exciting light source, an exciting light monochromator, a cell for a sample under study, a system for collecting emission of a sample, an analyzing monochromator, a photomultiplier tube, and a system for recording and analyzing the emission spectrum [1–3]. Leading foreign manufacturers of spectrofluorimeters, such as Horiba, PerkinElmer, Thermo, Shimadzu, Hitachi, mainly produce devices for measuring stationary fluorescence, continuously updating and developing their families of devices. The devices use modern elements of microelectronic technology,

new materials and promising design solutions (see, for example, [4, 5]). In our country, spectrofluorimeters suitable for studying biological objects are not produced. At the Institute of Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, work was carried out to find technical solutions that would make it possible to develop a fairly cheap universal spectrofluorimeter capable of quickly measuring the emission spectra of biological objects in a wide temperature range and suitable for titrating a liquid sample under study with small additives of various compounds.

DEVICE DESIGN

Spectrofluorimeter SFL-S, the general view of which is shown in Fig. 1 is constructed according to the classical registration scheme, when the emission of the studied sample is collected at an angle of 90° to the direction of the exciting light beam. In this case, the exciting flux is formed by monochromatization of the continuous emission spectrum of the XBO 150W / GROFR xenon lamp by OSRAM.

The SFL-S spectrofluorimeter includes a spectrofluorimetric unit, a titration device, an attachment for fast mixing of solutions and a control computer. The spectrofluorimetric unit combines the optomechanical system of the device and electronic means that ensure the control process of the spectrofluorimeter.

Fig. 2 shows a simplified block diagram of the SFL-S spectrofluorimetric unit. This unit consists of the following functional units: a source of exciting light, excitation and recording monochromators,

Fig. 1. General view of the SFL-S spectrofluorimeter with an open cuvette chamber**Fig. 2.** Simplified block diagram of the SFL-S spectrofluorimeter

a photoelectronic converter (FEC) and a multichannel photoelectronic converter (MFEC), a cell compartment, lamp power supplies, power, analog and digital circuits, a controller board, programmable thermostat, multichannel photoelectronic multiplier (PEM) controller board, ventilation means for spectrofluorimetric unit.

The excitation and recording monochromators use concave holographic diffraction gratings with 1200 grooves per mm, a radius of 150 mm and a working spectral range of 200–900 nm, which provide high transmission and low level of scattered light. Monochromators are made in the form of independent structural assemblies, which include both optical and mechanical elements, as well as electronic modules that ensure the operation of these nodes.

To ensure uniform tuning of the monochromator to wavelengths during scanning and, accordingly, for the linearity of the instrument scale along the wavelength axis of the measured spectrum, we used a sine mechanism and a digital microcontroller that controls the stepping motor of the diffraction grating drive. To record stationary emission spectra with mechanical scanning, we used Hamamatsu R6356 photomultiplier, which has a high detection sensitivity in the range of 185–900 nm and a minimum dark current of 0.1 nA at a nominal gain.

The most important feature of the spectrofluorimeter is the possibility of introducing a multichannel receiver in the form of a 32-channel Hamamatsu H7260 photomultiplier into the emission detection channel of the sample under study for fast recording of spectra.

To study the interactions of various compounds with each other, we have developed a dispenser that allow to add small volumes of solutions of various substances to the measuring cell according to a given program. Dosing of reagents in the dispenser is provided by step-by-step movement of the plunger of a precision microsyringe. The dispenser is designed to use Hamilton 1700 Series N or TLL micro syringes. It is possible to use micro syringes from other manufacturers with similar design characteristics. The dispenser stepper drive ensures the movement of the micro syringe plunger by at least 50 mm. In this case, the minimum movement of the plunger of the micro syringe (unit step) is 6.3 μm , time for the dispenser to perform this movement is no more than 2 ms.

To implement the possibility of fast mixing of solutions in the measuring cell, we used an RX2000 fast mixing attachment by Applied Photophysics. The

minimum mixing volume is 0.3 ml. The samples are mixed pneumatically, with a dead time of about 6 ms. The required temperature of samples in syringes and cuvette is provided using an external water thermostat.

INSTRUMENT CONTROL SYSTEM

Upper control level

The control system of the SFL-S spectrofluorimeter includes three levels. The upper level, which is the control computer of the instrument, provides general control of the spectrofluorimeter. Through the interface windows of the computer monitor, you can select the measurement mode, enter the settings of the selected mode, start the measurement process and display the results. In the process of measurements, the upper-level software generates a set of control commands corresponding to the selected measurement mode, maintains the flow of information in the process of measurements, and performs the necessary mathematical processing of the obtained data arrays. After completion of the measurement cycle, the results are saved a form to be selected.

Second level of control

The role of the second level of control of the device is performed by the controller board of the spectrofluorimetric unit, made on an 8-bit AVR microcontroller ATmega128-16AU by Atmel with an improved RISC architecture, having 53 inputs / outputs and 128 kbytes of programmable memory. The tasks of the second level include: ensuring data exchange with the upper control level, controlling the process of initialization of devices of the spectrofluorimetric unit and microtiter, maintaining cyclic processes of measuring the intensity according to the main and reference channels, control of the temperature of the cuvette holder and the sample under study using temperature sensors, maintaining the measurement process in the established mode in accordance with the settings defined for this mode by the upper-level control system.

Third level of control

The role of the third level of control of the spectrofluorimeter is performed by 8-bit AVR microcontrollers

Fig. 3. The main window of the program with the output of measurement results

ATmega8-16AU by Atmel, which have 23 inputs / outputs and 8 kbytes of programmable memory installed on the control boards of functional units of the spectrofluorimetric unit. The role of this control level is to manage the drivers of the executive mechanisms of functional units, which relieves the controller of the photometric unit from routine procedures. In addition, the controllers of devices such as a multi-channel PEM controller board and a programmable cuvette compartment thermostat provide autonomous process control at the level of these nodes.

User interface

The spectrofluorimeter control is started by the SFL1.exe program. The main program window opens on the monitor. Fig. 3 shows an example of a program window with the set mode, settings and measurement results. Measurement conditions are set by selecting the required mode and sub-mode in the menu.

The main settings panel, located in the upper part of the window, is designed for tuning monochromators to the specified wavelengths, setting monochromator slits, setting the spectral interval of monochromators, scanning step and accumulation time of spectrum points, setting the voltage supplying the PEM and the gains of the recording path, setting the measurement temperature. In the bottom line of the program window, you can control the level of fluorescence intensity recorded by the measuring channel of the spectrofluorimeter. The main panel is also designed for setting time constant of the recording path, stirring rate of the magnetic stirrer in the cuvette holder, the number of repetitions and the form of presentation of measurement results in spot measurement mode. The PEM signal is displayed in digital and histogram forms.

SPECTRAL AND TECHNICAL DEVICE SPECIFICATIONS

- The working spectral range of the excitation channel is 220–800 nm, the recording channel is 240–900 nm. The error in setting the wavelengths of monochromators does not exceed ± 1 nm.

- The separated spectral interval of monochromators of both channels has fixed values of 1, 2, 5, 10 and 20 nm.
- The scanning step in the mechanical spectrum sweep mode has the values of 0.2, 1.0, 2.0 and 5.0 nm.
- Spectrum points accumulation time: 0.04, 0.2, 1.0 and 5.0 s.
- Minimum time between sequential registration of two spectra of 32 points in the multichannel registration mode 0.04 s.
- Signal-to-noise ratio of about 200 when registering the Raman spectrum of water with an accumulation time of the registration channel of 1 s and spectral intervals of monochromators of both channels of 10 nm.

DEMONSTRATION OF SPECTROFLUORIMETER WORK IN VARIOUS MODES

Fig. 4 shows the fluorescence spectra of aqueous solutions of phenylalanine (1) and fluorescein (2), measured in the mode of mechanical spectrum sweep. The spectrum of phenylalanine, an aromatic amino acid that is part of most proteins, was measured at a concentration of 0.08 mg / ml and a voltage on a photomultiplier of 800 V in terms of light excitation at a wavelength of 265 nm and spectral slits of excitation and recording monochromators of 5 and 2 nm, respectively. The fluorescence quantum yield of phenylalanine in an aqueous solution is very low and amounts to about 0.04 [3]. A well-known vibrational structure is traced in the fluorescence spectrum of phenylalanine [2, 3]. The emission spectrum of fluorescein was measured at its extremely low concentration

$5 \cdot 10^{-6}$ mg / ml and a PEM voltage of 600 V, monochromator slits for excitation and recording of 5 nm. This shows that in terms of sensitivity and spectral characteristics, the SFL-S spectrofluorimeter in the UV and visible regions is not inferior to the best foreign devices.

Fig. 4. Fluorescence spectra of aqueous solutions of phenylalanine (1) and fluorescein (2). Conditions: for (1): the concentration is 0.08 mg / ml, the voltage on the PEM is 800 V, the excitation wavelength is 265 nm, the width of the spectral slits of the excitation and emission monochromators is 5 and 2 nm, respectively; for (2): concentration is $5 \cdot 10^{-6}$ mg / ml, voltage across the PMT is 600 V, excitation is 460 nm, spectral slit width of monochromators is 5 nm

Fig. 5. Model experiment on titration of 2 ml of water with tryptophan mother liquor (concentration is 0.3 mg / ml) using an automated dispenser.
a — fluorescence spectra; b — dependence of the fluorescence intensity of tryptophan at 350 nm on the added volume, excitation wavelength is 280 nm, voltage across the PEM is 600 V

Fig. 5 shows the results of a model titrimetric experiment with the use of an automated dispenser attached to the device.

The presented fluorescence spectra were obtained by automatic addition of 5 μ l of a tryptophan solution, that is an aromatic amino acid found in most proteins, at a concentration of 0.3 mg / ml to the cuvette with 2 ml of water at a given time interval in a magnetic stirrer mode. Tryptophan concentration in the cuvette is $0.75 \cdot 10^{-3}$ mg / ml after the first addition, the final is 0.047 mg / ml. The wavelength of the exciting light is 280 nm, the recording wavelength is 350 nm. The voltage across the PEM is 600 V. The monochromator slits are 5 nm.

To measure the temperature dependence of the fluorescence intensity of the sample under study in the main menu of the software window, select the ПЕ-ЖИМ / MODE menu item, then from the drop-down submenu select the "Температурная зависимость /

Temperature dependence" mode, and then the "Точечные измерения / Point measurements" submode. Fig. 6 shows the dependence of the fluorescence intensity in terms of 350 nm of an aqueous tryptophan solution. The dependence is measured in the programmed control mode of temperature changing with a interval of 2 $^{\circ}$ C.

Fig. 7 shows the results of an experiment to study the kinetics of dissociation of calcium ions from the calcium-binding protein — cod parvalbumin [6]. Cod parvalbumin (molecular weight about 12 kDa) has two strong binding sites for calcium ions. The fluorescence parameters of its only tryptophan residue (position of the spectrum maximum and the quantum yield of fluorescence) strongly depend on the degree of occupancy of its binding sites with calcium [7]. With rapid mixing of a solution of calcium-saturated parvalbumin with divalent cation chelator EDTA (ethyle-

Fig. 6. Temperature dependence of the fluorescence intensity in 350 nm of an aqueous solution of tryptophan, measured in the mode of programmed heating of the solution with a interval of 2 $^{\circ}$ C.
Excitation wavelength is 280 nm. PEM voltage is 600 V, spectral slit width of monochromators is 5 nm

Fig. 7. Kinetics of changes in the fluorescence spectra of cod parvalbumin during calcium dissociation under the action of the chelator of divalent cations EDTA.

An RX2000 fast mixing attachment (Applied Photophysics) was used for recording with an H7260 multi-channel PEM (Hamamatsu). Protein concentration is 50 μ M, Hepes is 0.05 M, pH is 8.1. The excitation wavelength is 280 nm, the voltage across the photomultiplier is 700 V, and the spectral slit width of the monochromators is 5 nm. The interval between spectra is 0.2 s. The inset shows the kinetics of changes in the relative area A under the emission spectra

nediamine tetraacetic acid) at pH 8.1 using an RX2000 rapid mixing attachment (Applied Photophysics Ltd, Leatherhead, UK), calcium ions are removed from the protein and transferred to the chelator. This rapid process is well traced by the change in the tryptophan fluorescence spectra of parvalbumin upon registration with a multichannel PEM H7260 (Hamamatsu, Japan) with an interval of 0.2 s between successively measured spectra. When removing calcium from parvalbumin, a long-wavelength shift of the maximum of the tryptophan fluorescence spectrum by almost 30 nm and a sharp drop in the fluorescence quantum yield occur, which corresponds to the movement of its only tryptophan residue from the inner part of the protein to its surface into the aqueous environment [2, 3, 7]. Note that to study the kinetics

by the stopped flow method, modern spectrofluorimeters usually record emission at one wavelength. The inset in Fig. 7 shows the change in the area under the emission spectra depending on time. The experimental results presented make it possible to measure the rate constants of the dissociation of calcium ions from the parvalbumin binding sites, which is very important for understanding the mechanisms of the functioning of this protein.

CONCLUSION

For the first time in Russia, a high-speed spectrofluorimeter has been developed, which, in terms of spectral and technical characteristics, is not inferior to similar devices of foreign firms (see, for example, [4,

5, 8, 9].

The spectrofluorimeter SFL-S registers the fluorescence spectra of the investigated solutions in 32 channels (points of the spectral curve) simultaneously at a rate of more than 20 spectra per second. At the same time, the equipment of the device allows, simultaneously with multichannel recording of fluorescence, to change the temperature of the test sample according to a predetermined algorithm, as well as to carry out microtitration of solutions in the cuvette of the device using a controlled automated microdosing unit. The complexity of the device significantly expands the possibilities of carrying out complex biochemical and biophysical experiments.

REFERENCES

1. Parker S. *Fotolumineszenziya rastvorov* [Photoluminescence of solutions]. Moscow, Mir Publ., 1972. 510 p. (In Russ.).
2. Permyakov E.A. *Luminescent Spectroscopy of Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1993. 164 p.
3. Permyakov E.A. *Metod sobstvennoy lyumineszenzii belka* [Protein intrinsic luminescence method]. Moscow, Nauka Publ., 2003. 189 p. (In Russ.).
4. *RF-6000 Fluorescence Spectrofluorometer*. URL: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/fluorescence-spectroscopy/rf-6000.html>
5. *Spektrofluorimetr FluoroLog 3*. URL: <http://www.nytek.ru/catalog/spectrofluorometers/fluorolog-3/>
6. Permyakov E.A. *Parvalbumin*. Nova Science Publishers. New York, 2006. 196 p.
7. Permyakov E.A., Yarmolenko V.V., Emelyanenko V.I., Burstein E.A., Gerday C., Closset J. Fluorescence studies of the calcium binding to whiting (*Gadus merlangus*) parvalbumin. *Eur. J. Biochem.*, 1980, vol. 109, no. 1, pp. 307-315.
8. *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer*. URL: <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/fluorescence-systems/cary-eclipse-fluorescence-spectrophotometer>
9. *Fluorescence Spectrophotometer F-7100*. URL: https://www.hitachi-hightech.com/global/product_detail/?pn=ana-f7100

Contacts: *Emelyanenko Viktor Ivanovich*,
emelyane@rambler.ru

Article received by the editorial office on 23.03.2021