



Медицинский алфавит
Серии научно-практических рецензируемых журналов

Современная ЛАБОРАТОРИЯ

№2

11 / 2013

Modern Laboratory

MEDICAL ALPHABET Russian Professional Medical Journal



- Фундаментальные основы лабораторной медицины
- Разработка, производство, технологии
- Лабораторное оборудование
- Реагенты
- Новые методы
- Практика
- Экспресс-диагностика
- Организация лабораторной службы
- Конгрессы и конференции

Наш индекс в каталоге
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

www.medalfavit.ru



Волшебный свет люминесценции

О. В. Егорова, К. Т. Н.

ООО КФ «Микроскоп Плюс», Санкт-Петербург

*Чудный свет кругом струится,
Но не греет, не дымится*

П. П. Ершов, «Конек-Горбунук»

Люминесцентный метод исследования в микроскопии нашел свое широкое применение недавно по меркам понятия «время». С середины 70-х годов XX века это направление претерпело значительное изменение как с точки зрения распространения прежде всего в практическую биологию и медицину, так и с точки зрения реализации с помощью разных типов и классов микроскопов, а также различных источников света. Интересно, что производство люминесцентных микроскопов налажено на разных производствах Германии, Австрии, Японии, Китая.

Недавно в интернете натолкнулась на следующее: «Термин „люминесценция“ (буквально — очень слабое свечение) был введен в науку в 1889 году немецким физиком Айххардом Эрнстом Видеманом. Им обозначают самосвечение тел, излучение видимого света без нагрева источника, холодное свечение» [1].

Фотолюминесценция — свечение объектов, возникающее в результате поглощенной ими лучистой энергии. Фотолюминесценцию условно подразделяют на флуоресценцию, т. е. свечение со временем затухания, и фосфоресценцию, которая продолжается более длительное время после прекращения возбуждения.

Термин «флуоресценция» происходит от названия минерала флюорит, у которого она впервые была обнаружена, и лат. — *essent* — суффикс, означающий слабое действие. Впервые флуоресценцию соединений химина наблюдал физик Джордж Стокс в 1852 году [2].

Люминесценция характеризует способность вещества испускать излучение при воздействии на него

внешней энергии (энергии возбуждения). Излучение люминесценции — это избыток излучения, превышающий тепловое излучение вещества, которое возникает при данной температуре. Длительность излучения люминесценции значительно превышает период световых волн.

Вследствие некоторых причин свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса, рис. 1). Поэтому люминесценцию выгодно возбуждать либо ультрафиолетовыми лучами (300–400 нм), либо сине-фиолетовыми. В обоих случаях (люминесценции и фотолюминесценции) возникает свечение в цветовой гамме всего или большей части видимого спектра. Спектр флуоресценции остается неизменным при любой длине волны возбуждаемого излучения.

Этот вид люминесценции носит название наведенной (вторичной), в отличие от первичной — собственной флуоресценции, нередко проявляемой витаминами, многими пигментами, некоторыми жировыми веществами и антибиотиками, встречающимися в живых организмах, некоторыми продуктами нормального и патологического обмена.

С помощью специальных красителей (флуорохромов), не вызывающих сильной окраски объектов в обычном свете, возникает флуоресценция при облучении ультрафиолетовыми лучами. Из синтетических флуорохромов наилучшие результаты дают акридин оранжевый, родамин, ФИТЦ.

Люминесцентные микроскопы нашли свое применение не только в научных исследованиях, но и в генетических, бактериологических и иммунологических лабораториях.

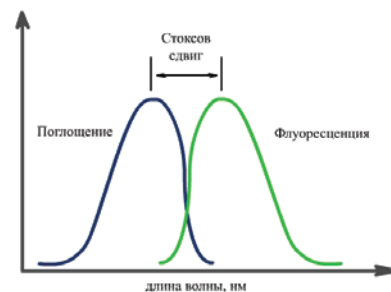


Рис. 1. Графическая иллюстрация правила Стокса.

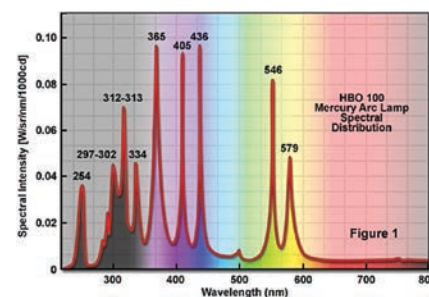


Рис. 2. Спектральные линии ртутной лампы HBO 100.

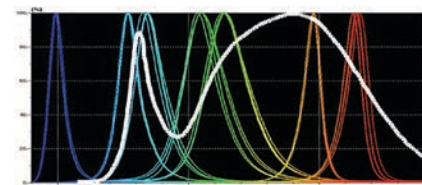


Рис. 3. Светодиоды, применяемые в люминесцентной микроскопии: комплект с длинами волн 365 нм, 380 нм, 400 нм, 455 нм, 470 нм, 505 нм, 530 нм, white LED, 590 нм, 615 нм, 625 нм (Carl Zeiss, Германия).

Обычно в люминесцентной микроскопии используются ртутные лампы. В табл. 1 и на рис. 2 представлены основные спектральные линии ртутных ламп или фраунгоферовых линий.

Большинство красителей разрабатывались с «оглядкой» на спектральные линии ртутной лампы. Тенденции современной микроско-

Таблица 1

Обозначение	Длина волны, нм	Цвет
i	365,00	темно-фиолетовый
h	404,36	фиолетовый
g	435,83	сине-фиолетовый
f'	479,99	синий
f	486,13	синий
F	486,00	зеленый
e	546,07	зеленый
d	587,56	желто-оранжевый
D	589,29	желто-оранжевый
c'	643,85	красный
c	656,27	красный
C	656,00	красный
r	706,52	темно-красный

Таблица 2

№	Наименование модели	Тип / класс модели	Внешний вид	Источник света для люминесцентного исследования
1	MC 100 FXP	Тип: биологический люминесцентный; класс сложности: учебный		Ртутная лампа, 100 Вт
2	MC 100 FXP LED			3 W LED (465–475 нм)
3	MC 300 FXP	Тип: биологический люминесцентный; класс сложности: рабочий		Ртутная лампа, 100 Вт
4	MC 500 FXP	Тип: биологический люминесцентный; класс сложности: лабораторный, упрощенный исследовательский		Ртутная лампа, 100 Вт
5	MC 800 F, MC 900 F	Тип: стереоскопический люминесцентный; класс сложности: лабораторный и исследовательский		Ртутная лампа 100 Вт

пии таковы, что все больше в качестве источника света используется светодиод. Светодиод является узкополосным источником света (рис. 3), т.е. в определенной длине волны в небольшом спектральном диапазоне имеется максимум интенсивности света. В связи с этим целесообразно сравнивать, какие именно спектральные линии ртутной лампы соответствуют рабочему светодиоду.

Применение светодиодов, с одной стороны, обусловлено долговечностью лампы, т.е. если ртутная лампа ярко светит 300–500 часов, то светодиод — порядка 50 000 часов. С другой стороны, источник света не перегревается при длительной работе, при этом габариты узла крепления и самого светодиода незначительные. Есть еще один положительный факт — возможность регулирования яркости свечения, таким образом, уменьшается несанкционированное «обесцвечивание» («выжигание») объектов.

Рассмотрим номенклатуру люминесцентных микроскопов фирмы Micros (Австрия), которая представлена в табл. 2.

Как видно из таблицы, основным источником света является ртутная лампа 100 Вт. Однако эти микроскопы все-таки отличаются друг от друга и прежде всего классом сложности. Класс сложности определяется технологией изготовления и сборки, применяемых материалов, а значит и качеством изображения. Все это выливается в цену.

Люминесцентные микроскопы должны обязательно комплектоваться объективами с минимумом собственной люминесценции. В этих объективах и стекло, и клеящие материалы, а также специальное иммерсионное масло для объектива 100× Oil являются нелюминесцирующими: в изображении нет цветного фона, т.е. фон является абсолютно черным, на котором ярко светятся соответствующие метки. Цвет фона, если он есть, совпадает с цветом свечения или близкого к нему, что приводит к снижению яркости свечения метки, а то и к тому, что свечения не видно.

Люминесцентные микроскопы моделей MC 100 FXP и MC 100 FXPLED комплектуются люминесцентными объективами серии **FL ICO² Plan** с параметрами 4×/0,10 (pp 17,8 мм), 10×/0,25 (pp 17,96 мм), 40×/0,65 (pp 4,5 мм), 100×/1,25 (pp 1,81 мм). Линейное поле окуляров 10× равно 20 мм (посадочный диаметр 23 мм). Модель MC 100 XR имеет два блока люминесцентных светофильтров (табл. 3, рис. 4).

Дополнительно модель можно доукомплектовать еще одним блоком для УФ-излучения. Для этих целей применяется узкополосный светофильтр возбуждения с диапазоном длин волн 450–490 нм и широкополосными запирающими светофильтрами λ — 530 нм и λ — 590 нм.

Что касается люминесцентного микроскопа с LED-осветителем (рис. 5, табл. 4), то он практически имеет те же параметры, что и базовый вариант, по крайней мере, и окуляры, и комплект люминесцентных объективов те же.

Диодный источник диктует свой набор светофильтров. Обратите на это внимание. Сравнивайте с параметрами флуорохромов (меток) и длиной волны эмиссии своих объектов.

Рабочая (MC 300 FXP) и лабораторная (MC 500 FXP) модели люминесцентных микроскопов (пп. 3 и 4 табл. 2) имеют в качестве источника света ртутную лампу мощностью 100 Вт. В табл. 5 приведены параметры блоков люминесцентных светофильтров. Внимательно их изучите, прежде чем покупать ту или иную модель! Ваши вопросы говорят о том, что именно этот момент требует пристального внимания.

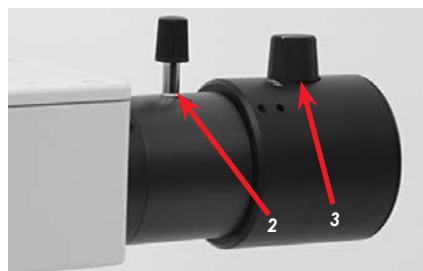


Рис. 5. Люминесцентный осветитель LED: регулятор яркости светодиода (1); фокусировка коллектора (2).

Таблица 3

Наименование блока	Светофильтр возбуждения	Полупрозрачное зеркало (дихроичное)	Светофильтр запирающий
B (синий свет)	EX490 (широкополосный): λ возбуждения — 490 нм	DM510 λ — 510 нм	BA530 (широкополосный): λ запирающий — 530 нм
G (зеленый свет)	EX545 (широкополосный): λ возбуждения — 545 нм	DM580 λ — 580 нм	BA590 (широкополосный): λ запирающий — 590 нм

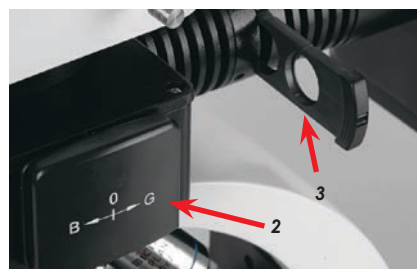


Рис. 4. Люминесцентный модуль: слева люминесцентный осветитель отраженного света с окном для контроля положения светящегося тела (1) ртутной лампы; справа представлен узел крепления блоков люминесцентных светофильтров (2) и подвижная вставка для ослабляющих светофильтров (3).

Таблица 4

Светофильтр возбуждения	Полупрозрачное зеркало (дихроичное)	Светофильтр запирающий
Синяя		
BP460–490 (узкополосный): λ возбуждения — 460–490 нм	DM505 λ — 505 нм	BA515 (широкополосный): λ запирающий — 515 нм
Светло-зеленая (опция)		
BP510–550 (узкополосный): λ возбуждения — 510–550 нм	DM570 λ — 570 нм	BA590 (широкополосный): λ запирающий — 590 нм
Светодиод: длина волны свечения 465–475 нм.		

Таблица 5

Наименование блока	Светофильтр возбуждения	Полупрозрачное зеркало (дихроичное)	Светофильтр запирающий
Модель MC 300 FXP			
B (синий свет) *	EX490 (широкополосный): λ возбуждения — 490 нм	DM510 λ — 510 нм	BA530 (широкополосный): λ запирающий — 530 нм
G (зеленый свет) *	EX545 (широкополосный): λ возбуждения — 545 нм	DM580 λ — 580 нм	BA590 (широкополосный): λ запирающий — 530 нм
UV (УФ, опция)	BP450–490 (узкополосный): λ возбуждения — 450–490 нм	Нет информации	BA530 (широкополосный): λ запирающий — 530 нм BA590 (широкополосный): λ запирающий — 590 нм
Модель MC 500 FXP			
B (синий свет)	EX460–490 (узкополосный): λ возбуждения — 460–490 нм	DM500 λ — 500 нм	BA520 (широкополосный): λ запирающий — 520 нм
G (зеленый свет) **	EX510–550 (узкополосный): λ возбуждения — 510–550 нм	DM570 λ — 570 нм	BA590 (широкополосный): λ запирающий — 590 нм
UV (УФ, опция)	BP330–385 (узкополосный): λ возбуждения — 330–385 нм	DM400 λ — 400 нм	BA420 (широкополосный): λ запирающий — 420 нм
V (фиолетовый свет, опция)	BP400–410 (узкополосный): λ возбуждения — 400–410 нм	DM455 λ — 455 нм	BA455 (широкополосный): λ запирающий — 455 нм

* — комплект аналогичен MC 100 FXP.

** — комплект аналогичен MC 100 FXP LED.

micros

МИКРОСКОПЫ ЕВРОПЕЙСКОГО КАЧЕСТВА



Компания MICROS является членом Британского Королевского Общества Микроскопии, имеет сертификат TUV CERT Austria. Каждый микроскоп произведен в соответствии с Е-нормам и проходит контроль качества.

www.micross-russia.ru

Москва

ул. Бутырская, 62, офис 619
Телефон/факс: +7 (495) 287-89-80
E-mail: [micross@micross-russia.com](mailto:micros@micross-russia.com)

Екатеринбург

ул. Ясная, 35
Телефон/факс: +7 (343) 231-13-08
E-mail: [micross@omt-ural.ru](mailto:micros@omt-ural.ru)

Таблица 6

Стандартные объективы FL ICO ² PLAN		Люминесцентные объективы Fluorescence ICO ² PLAN		Увеличение объектива
Входная числовая апертура	Выходная числовая апертура	Входная числовая апертура	Выходная числовая апертура	
0,10	0,0250	0,13	0,0325	4
0,25	0,0250	0,30	0,0300	10×
–	–	0,50	0,0250	20×
0,65	0,0160	0,75	0,0187	40×
1,25	0,0125	1,30	0,0130	100×

На рис. 6 представлены люминесцентные осветители рассматриваемых моделей.

Конструкции узла крепления ртутной лампы разные по способу настройки. Кроме этого, в модели MC 500 FXP блоки светофильтров крепятся сообразно классу сложности (лабораторная или упрощенная исследовательская модель) с помощью револьверного устройства, что позволяет устанавливать до шести люминесцентных блоков.

Обращая внимание на то, что наряду со стандартными люминесцентными объективами серии **FL ICO² PLAN**, скорректированными на «бесконечность» для модели MC 100 FXP, фирмой выпускаются объективы серии **Fluorescence ICO² PLAN** для моделей MC 300 FXP и MC 500 FXP. В отличие от стандартных люминесцентных объективов, люминесцентные объективы серии **Fluorescence** отличаются повышенной числовой апертурой. Этот параметр определяет не только разреша-



Рис. 6. Люминесцентные осветители: слева мод. MC 300 FXP и справа мод. MC 500 FXP LED.

ющую способность микроскопа в целом, но и энергетическую составляющую изображения, т.е. повышенную возможность зафиксировать слабое люминесцентное свечение. Комплект включает объективы следующих параметров: 4×/0,13 (pp 19,8 мм); 10×/0,30 (pp 12,4 мм); 20×/0,50 (pp 1,5 мм); 40×/0,75 (pp 0,35 мм) и 100×/1,30 (pp 0,13 мм). В табл. 6 представлено сравнение объективов по энергетической составляющей.

В заключение хотелось бы обратить внимание еще на один тип люминесцентных микроскопов. Особенностью номенклатурного ряда фирмы Micros является наличие панкратических стереоскопических микроско-

пов с люминесцентным осветителем. Модели MC 800 F и MC 900 F (п. 5, табл. 2) по схеме Аббе имеют плавную смену увеличения с коэффициентом zoom 1:8 (стандартное увеличение 8–64×) и zoom 1:10 (стандартное увеличение 8–80×). Стандартным основным объективом является планахромат 1× с числовой апертурой 0,09, обеспечивающий рабочее расстояние микроскопов 78 мм. Окуляры 10× с линейным полем 22 мм обеспечивают линейное поле на предмете для микроскопа MC 800 F 27,5–3,4 мм и 27,5–2,75 мм для MC 900 F. Стереомикроскоп в сочетании с ртутной лампой 100 Вт и блоками люминесцентных светофильтров GFB-B (зеленый: возбуждающий 460–500 нм; полупрозрачное зеркало 505 нм; запирающий 510–560 нм) и GFB-L (зеленый / красный: возбуждающий 460–500 нм; полупрозрачное зеркало 505 нм; запирающий 510 нм) обеспечивают научные исследования, а также процессы производственного контроля и экспертизы в биологии и медицине.

Список литературы

1. Келер В.А. «Сергей Вавилов» из серии ЖЗЛ, 1961.
2. Материалы с сайта <http://commons.wikimedia.org>.
3. Егорова О.В. «С микроскопом на „ты“». Шаг в XXI век», 2006.



РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ



План мероприятий, проводимых Российской ассоциацией медицинской лабораторной диагностики в 2013 году

Июнь 2013 г., г. Москва

Всероссийский научно-образовательный форум специалистов клинической лабораторной диагностики ЛПУ РЖД. Специализированная выставка «Лабмеддиагностика-2013».

11–12 сентября 2013 г., г. Волгоград

Научно-практическая конференция «Современная лабораторная медицина: инновационные технологии лабораторного анализа и новые возможности их клинического применения». Специализированная выставка «Лабораторная медицина-2013».

Октябрь 2013 г., г. Москва

V Съезд Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики (20-летие РАМЛД).

23–24 октября 2013 г., г. Челябинск

Научно-практическая конференция «Современные лабораторные тесты: новые технологии и клиническая значимость». Специализированная выставка «Лабмедицина-2013».

119526, Москва, а/я 117

Тел./факс: +7 (495) 433-24-04

www.ramld.ru E-mail: ramld@ramld.ru