

НОВЫЕ ПОДЛОЖКИ, УСИЛИВАЮЩИЕ СИГНАЛЫ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ, ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Г.И. ДОВБЕШКО,¹ Е.М. ФЕСЕНКО,¹ В.В. БОЙКО,¹ В.Ф. ГОРЧЕВ,²
С.О. КАРАХИН,² Н.Я. ГРИДИНА,³ В.С. ГОРЕЛИК,⁴ В.Н. МОИСЕЕНКО⁵

¹Институт физики НАН Украины
(Просп. Науки, 46, Киев 03680)

²Институт Биохимии им. О.В. Палладина НАН Украины
(Ул. Леонтовича, 9, Киев 01601)

³Институт нейрохирургии имени А.П. Ромоданова АМН Украины
(Ул. Мануильского, 32, Киев 04050)

⁴Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН
(Ленинский просп. 53, Москва 117924, Россия)

⁵Днепропетровский национальный университет
(Просп. Гагарина, 72, Днепропетровск 49050)

УДК 539
© 2012

В работе показана возможность использования фотонных кристаллов, созданных на основе искусственных опалов, в качестве подложек для люминесцентной микроскопии биологических объектов. Изучено пространственное распределение фотолюминесценции кластеров ДНК на поверхности опалов и на шероховатых золотых подложках при возбуждении ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм. На примере образцов клеток крови продемонстрирована возможность визуализации биологических объектов при использовании элементов наноструктуры искусственных опалов в качестве меток и усилителей изображения.

1. Введение

Известно, что для решения ряда биологических задач необходимо получать контрастное изображение клеток и их компонент. Проблема состоит в том, что клетки, являясь прозрачными объектами, плохо видны в оптическом микроскопе. Для решения такой проблемы используют различные подходы. К ним можно отнести использование в качестве люминесцентных меток различных красителей, квантовых точек и металлических наночастиц [1]. Связываясь с различными молекулярными структурами, эти метки под воздействием лазерного излучения люминесцируют, визуализируя место связи клетки с меткой. В частности, DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол) "окрашивает" ядра клеток или вызывает свечение комплексов с ДНК в синей области спектра; зеленый флуоресцентный белок (GFP-зеленый флуоресцентный бе-

лок) используется как метка протеинов, включая цитоскелет, и др [2]. Автолюминесценция компонентов клеток очень слабая и практически не видна даже при использовании конфокального микроскопа.

Иной подход основан на создании специальных оптических схем для визуализации прозрачных объектов. Примером такого типа является конфокальная и фазово-контрастная микроскопия [3]. Хороший результат дает также сочетание этих двух подходов.

Для визуализации клеток и их составляющих нами предложено использование особых подложек, выполняющих роль оптических элементов и одновременно люминесцирующих меток. Известно, что конфокальная микроскопия дает возможность детектирования люминесцирующих микрообъектов с помощью оптического микроскопа, диафрагма которого, расположенная перед детектором, обеспечивает регистрацию фотолюминесценции (ФЛ) только от объектов, находящихся непосредственно в фокальной плоскости. Таким образом удаётся создавать объёмные изображения анализируемых объектов. Метод конфокальной микроскопии обеспечивает высокую контрастность, большую глубину резкости и возможность послойного сканирования образцов. Это позволяет создавать трехмерные изображения отдельных клеток, срезов тканей и небольших организмов, что и обусловило широкое распространение метода в медико-биологических приложениях.

Ранее [4] для увеличения интенсивности ФЛ ДНК было предложено использовать искусственные опа-

лы как матрицы, заполненные анализируемым веществом. Известно [5, 6], что для возбуждения ФЛ ДНК, квантовый выход которой при комнатной температуре составляет менее 10^{-4} , используют различные красители: эдидиум бромид, акридиновый оранжевый и др., а применение стирил-цианиновых красителей для ДНК дает возможность получать двухфотонную люминесценцию в видимом диапазоне спектра [7]. Ранее нами было предложено [4] для усиления люминесценции ДНК вблизи 350 нм использовать синтетический опал. В работе [4] была показана также возможность получить свечение от молекул ДНК на поверхности синтетического опала (без понижения температуры и без использования красителей), и визуализировать кластеры ДНК при возбуждении длиной волны 365 нм. В данной работе мы приводим экспериментальные данные об использовании фотонных кристаллов (ФК), созданных на основе искусственных опалов, а также шероховатых золотых подложек для визуализации изображения биологических объектов: кластеров ДНК и клеток крови.

2. Материалы и методы

Применение конфокальной схемы приводит к увеличению контраста изображения за счет того, что “паразитный” свет от соседних точек анализируемого объекта не попадает на детектор в результате использования диафрагмы малого размера. “Платой” за увеличение контраста является необходимость применения достаточно сложных схем сканирования образца или светового пучка, что увеличивает время, необходимое для получения полной информации об исследуемом объекте.

Согласно критерию Релея для предельного разрешения (уменьшение интенсивности на 26% от значения максимума интенсивности) для конфокального микроскопа имеет место: $r_{\text{conf}} = 0,44 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 0,88 \frac{\lambda'}{D} F$. В то же время для обычного оптического микроскопа имеем: $r_{\text{resel}} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \theta} = 1,22 \frac{\lambda'}{D} F$ ($\lambda' = \lambda/n$). Таким образом, в случае конфокального микроскопа разрешение лишь в 1,4 раза лучше, чем в оптическом микроскопе [8]. Поэтому главным преимуществом конфокального микроскопа является не увеличение разрешения, а существенное возрастание контраста при формировании изображения.

Наши эксперименты были выполнены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа “Carl Zeiss LSM-510 META” с использованием объектива “Plan-Neofluar 40x/0,6 Corr”. Для получения

изображений объектов в обсуждаемом микроскопе используются лазеры с длинами волны 405, 458, 488 и 633 нм. Изображения объектов были зарегистрированы с помощью цифровой камеры “AxioCam” при возбуждении ФЛ ультрафиолетовой лампой HBO 100 с использованием синего (Fset01 wf), зеленого (Fset10 wf) и красного (Fset20 wf) фильтров. Изображения в схеме “на пропускание” в видимом диапазоне получали при использовании галогеновой лампы. Скорость сканирования зависит от разрешения и для микроскопа “LCM 510” составляет 1/5 секунды на слой при разрешении 512×512 . Максимальное разрешение составляет 2048×2048 [9].

Для оценки спектральной плотности ФЛ применялось сканирование вдоль поверхности образца в режиме “Lambda scan”, что позволило регистрировать спектр ФЛ с помощью линейки миниатюрных фотоприемников со спектральным разрешением 10,7 нм. Для количественного анализа использовали функцию ROI (Region of Interest), которая позволяла получить график зависимости интенсивности ФЛ от длины волны с усреднением по выделенной области.

3. Приготовление образцов

Образцы искусственных опалов были получены методом естественной седиментации глобул путем испарения реакционной смеси с заданной скоростью. Для синтеза глобул диоксида кремния был использован модифицированный метод Штобера [10]. Молярное соотношение компонентов реакционной смеси было следующим: $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4 = 0,76:18:11:0,14$. После осаждения полученные кристаллы подвергались отжигу при температуре 800 °С для удаления химически связанной воды и остатков органических соединений.

Для исследований были использованы шероховатые золотые подложки. Тонкая пленка золота была получена с помощью вакуумного термического осаждения золота 99,999% на стеклянную подложку (TF-1, 20×20 мм) с нанесенным слоем Cr. Толщина пленки золота составляла 300–350 Å с шероховатостью около 50 Å при прослойке Cr размером 10–20 Å [11].

Была подготовлена суспензия клеток крови в 0,9 % растворе хлористого натрия. Венозную кровь брали из локтевой вены с добавлением гепарина (0,1 мл на 10 мл крови). Клетки крови центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин. Плазму крови отбирали и к клеточному осадку добавляли равный объем изотонического раствора хлористого натрия. Пробири-

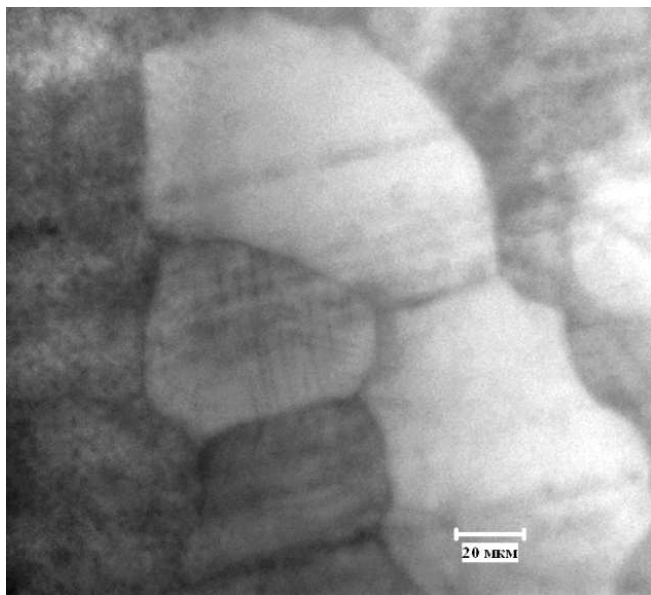


Рис. 1. Вид поверхности искусственного опала при возбуждении ультрафиолетовой лампой с регистрацией флуоресценции с использованием синего светофильтра типа "FSet01"

ку с образцом встряхивали и центрифугировали. Осадок из пробирки удалялся при сохранении 0,5 мл над клеточным объёмом. Клетки нанесли на стекло и на поверхность искусственных опалов для изучения под конфокальным микроскопом.

4. Результаты и их обсуждение

Поскольку поверхность ФК, созданного на основе опала, имеет доменную структуру и иризирует, на первом этапе были проведены оптические исследования поверхности исходного опала с использованием конфокального микроскопа. На рис. 1 представлены наблюдаемые области упорядоченной структуры (домены) поверхности опала с размерами от 40 до 250 мкм. Свечение поверхности ФК было зарегистрировано при возбуждении УФ светом от ртутной лампы с длиной волны 365 нм. Регистрируемое свечение от неоднородностей поверхности опала позволило хорошо различать отдельные домены.

Исследования показали [4, 12, 13], что в исходном ФК обнаруживается ФЛ с двумя интенсивными максимумами вблизи 400 и 500 нм и с несколькими слабыми полосами в области 600–800 нм. В работе [14] ФЛ искусственного опала связывают с наличием дефектов и примесей. Полосу с максимумом на длине волны 523 нм связывают с поверхностными состояниями $\equiv\text{Si-H}$ (энергия перехода 2,37 эВ); полосу с ма-

ксимумами на 652 и 692 нм относят к объёмным и поверхностным состояниям $\equiv\text{Si-O}$ с энергиями 1,9 и 1,79 эВ соответственно. Природа полосы вблизи 400 нм обсуждалась в литературе [12]. Её связывают с наличием различных примесей (в долевых количествах менее 10^{-5}): оксидов цинка, кальция, натрия, железа и циркония, попадающих в образец в технологическом процессе получения кристаллов. Интенсивность ФЛ исходного синтетического опала изменялась при перемещении от точки к точке по его поверхности (см. рис. 2). Для образцов с хорошо упорядоченной структурой, изменение интенсивности ФЛ вдоль поверхности наблюдалось с одинаковым коэффициентом для разных частот. Для образцов с менее упорядоченной структурой интенсивность свечения на разных частотах изменялась по-разному. Такая зависимость свечения синтетического опала от места на поверхности может быть связана с неоднородностью образца, наличием доменной структуры, изменением спектрального положения запрещенной зоны и неравномерным распределением примесей. Так как структура ФК сравнима с длиной волны видимого диапазона, можно ожидать локального возрастания электромагнитного поля примесной ФЛ и получить сигнал даже от очень малого количества примесей [15, 16]. Запрещенная зона ФК проявляется в полосе люминесценции, а именно, в спектральной области, где размещена запрещенная зона ФК, на контуре люминесценции должен регистрироваться провал [12]. Для исследованных нами кристаллов с размером глобул 240 нм брэгговское отражение находится вблизи 530 нм. Согласно с этим в спектрах ФЛ опала этой же области был зарегистрирован "провал" на (см. рис. 2).

Основной электронный переход S_0-S_1 в молекуле ДНК соответствует длине волны электромагнитного излучения, близкой к 260 нм. В результате поглощения ультрафиолетового кванта молекула ДНК переходит с основного состояния S_0 на первый (резонансный) электронный синглетный терм. Такой переход является разрешённым правилами отбора для однофотонных процессов. Несколько ниже по энергии находится триплетный терм, для которого однофотонные процессы в основное состояние запрещены по спину. Соответственно условием для возбуждения спектров ФЛ в ДНК является превышение энергии кванта возбуждающего излучения энергии резонансного электронного перехода, т.е. значение длины волны возбуждающего излучения должно быть меньше или, по крайней мере, сравнимо со значением 260 нм. После возбуждения молекулы ДНК с переходом на синглетный терм в результате однофотонного по-

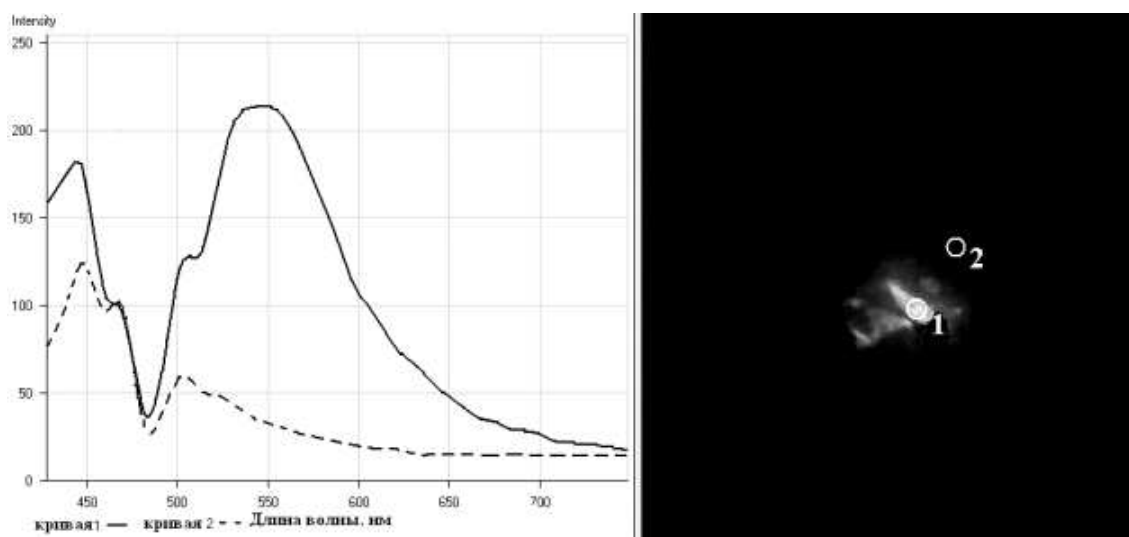


Рис. 2. Фотолюминесцентное изображение (справа) люминесцирующего участка поверхности искусственного опала в области дефекта, полученное в режиме Lambda Scan. Возбуждение фотолюминесценции осуществляется лазером на длине волны 405 нм, а ее регистрация – в диапазоне 422–754 нм с использованием Beamsplitter 405/488. На вставке слева приведены соответствующие спектры ФЛ, полученные от двух областей поверхности опала, отмеченных на рисунке справа

глощения возможны процессы конверсии, в результате которых молекула переходит на триплетный терм, характеризующийся очень малой силой осциллятора [17]. Кроме того, конверсия может происходить с терма S_0 на ряд других термов с малыми силами осцилляторов, обусловленных электронным строением нуклеиновых оснований, входящих в состав ДНК. В результате основная доля электромагнитной энергии, поглощённой молекулой ДНК, переходит в энергию теплового движения. В связи с этим квантовый выход ФЛ молекул ДНК чрезвычайно мал (менее 10^{-4}), что делает наблюдение фотолюминесценции нативной ДНК чрезвычайно затруднительным даже при использовании в качестве источников возбуждающих фотонов коротковолнового электромагнитного излучения с длиной волны, меньшей 260 нм. В связи с этим известные результаты о регистрации спектров ФЛ нативной (без использования меток) ДНК, возбуждаемой коротковолновым излучением [5, 6]) были получены лишь при низких температурах.

Для увеличения интенсивности ФЛ молекул ДНК, находящихся на поверхности конденсированной среды, нами предложено использовать два новых типа подложек: шероховатая плёнка золота и микроструктурированная поверхность искусственного опала.

На рис. 3 приведено изображение нитей ДНК, размещённых на шероховатой поверхности золота, полученное в результате регистрации ФЛ, возбуждаемой ультрафиолетовым излучением (365 нм). Как

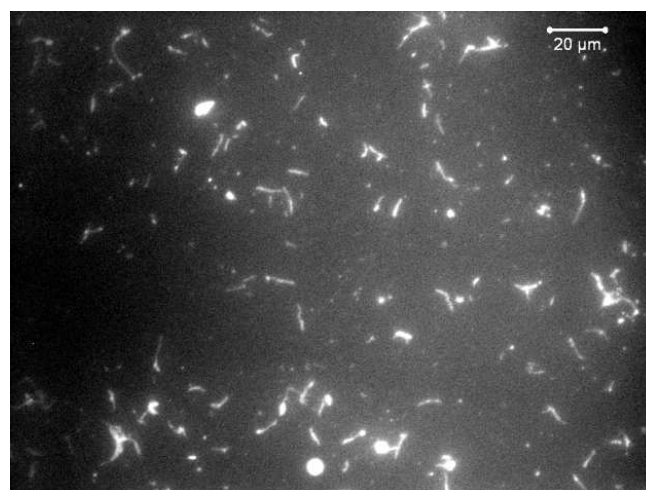


Рис. 3. Фотолюминесцентное изображение молекул ДНК, нанесённых на шероховатую золотую подложку, полученное с помощью конфокального микроскопа при возбуждении ФЛ ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм

видно из этого рисунка, объект наблюдается в виде нитей длиной 5–7 мкм толщиной около 1 мкм. Известно, что реальная толщина нитей ДНК составляет десятки нанометров. Такой вывод ранее подтверждён результатами исследований микроструктуры ДНК с помощью атомно-силового [18] и электронного микроскопов. Увеличение поперечных размеров (до 1 мкм) обсуждаемого объекта при наблюдении методом ФЛ с применением конфокального микроскопа

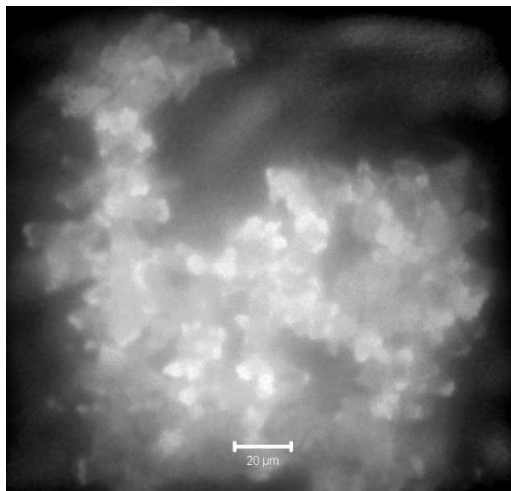


Рис. 4. Фотолюминесцентное изображение молекул ДНК, нанесённых на поверхность фотонного кристалла, полученное с помощью конфокального микроскопа при возбуждении ФЛ ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм

можно объяснить возможной конденсацией молекул ДНК с образованием микрокластеров на поверхности золота. Как видно из рис. 3, изображение нитей ДНК является достаточно ярким и отчётливым. Большая интенсивность сигнала ФЛ молекул ДНК, находящаяся на поверхности золота, может быть обусловлена проявлением известного эффекта гигантского усиления (на несколько порядков) эффективного электромагнитного поля ФЛ вблизи наночастиц золота. Такой эффект объясняется влиянием локализованных поверхностных плазмонов. С другой стороны, в качестве возможного механизма возрастания интенсивности ФЛ не исключены химические процессы переноса электронов от металла к молекулам ДНК с образованием новых электронных состояний в видимой области спектра. Фактически, это соответствует формированию новых флуоресцентных меток вблизи наночастиц золота. В результате самопроизвольного формирования меток в комплексе “золото–ДНК” ФЛ в ДНК возбуждается излучением среднего ультрафиолетового диапазона (365 нм).

На рис. 4 представлено изображение микрокластеров ДНК, нанесённых на поверхность ФК, полученное в свете ФЛ при возбуждении излучением с длиной волны 365 нм. Как видно из этого рисунка, изображение молекул ДНК носит более размытый характер, чем в случае использования шероховатой золотой подложки. Тем не менее, и в этом случае наблюдается достаточно интенсивный сигнал ФЛ, позволяющий получить информацию о пространствен-

ном распределении ДНК на поверхности подложки. Как известно, при размере глобул кремнезёма ФК 250 нм, размер пор между глобулами составляет около 50 нм, а размер каналов, выходящих на поверхность ФК, близок к 10 нм. Таким образом, размытость изображения нитей ДНК на поверхности фотонного кристалла, можно объяснить “проваливанием” молекул ДНК в объем фотонного кристалла через каналы между глобулами.

Наблюдаемый эффект возрастания интенсивности в свете ФЛ изображения кластеров ДНК, размещённых на поверхности ФК, можно объяснить, как и в случае с шероховатыми золотыми подложками, локальным возрастанием эффективного поля [19]. Однако в данном случае эффект имеет место не в результате плазмонного эффекта, а вследствие интерференционного усиления эффективного поля в фотонном кристалле, в результате возрастания плотности фотонных состояний вблизи дефектов и краёв запрещённой фотонной зоны [15]. Интерференционный характер усиления поля может служить дополнительной причиной размытия изображения биологического объекта на поверхности фотонного кристалла.

Следует отметить также, что наноструктурированное золото, как и наноструктурированный ФК, имеет целый ряд электронных переходов в видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра [20–21], соответствующих энергиям: 2,4 эВ (0,52 мкм); 2,5 эВ (0,5 мкм); и 1,9 эВ (0,65 мкм), 2,2 эВ (0,56 мкм), 3,2 эВ (0,3 мкм), 2,55 эВ (0,49 мкм), 3,0 эВ (0,41 мкм). Наличие таких уровней создаёт условия для формирования соответствующих меток в комплексах “ДНК–дефект подложки”, приводящих к появлению сигнала ФЛ при возбуждении излучением с длиной волны 365 нм.

Кроме того, как и при наличии неоднородностей на золотой подложке, в случае микроструктурированной подложки ФК возможно образование новых химических связей между молекулами ДНК и дефектами, присутствующими на поверхности ФК. Новые химические связи “ФК–ДНК” играют роль образовавшихся меток, приводящих к возникновению ФЛ при возбуждении излучением среднего УФ-диапазона (365 нм).

На рис. 5 представлены изображения клеток плазмы крови, а на рис. 6 соответствующие фотолюминесцентные изображения эритроцитов, нанесённых на поверхность искусственного опала. Как видно из этих рисунков, при настройке микроскопа на поверхностный слой клеток свечение наблюдается непосред-

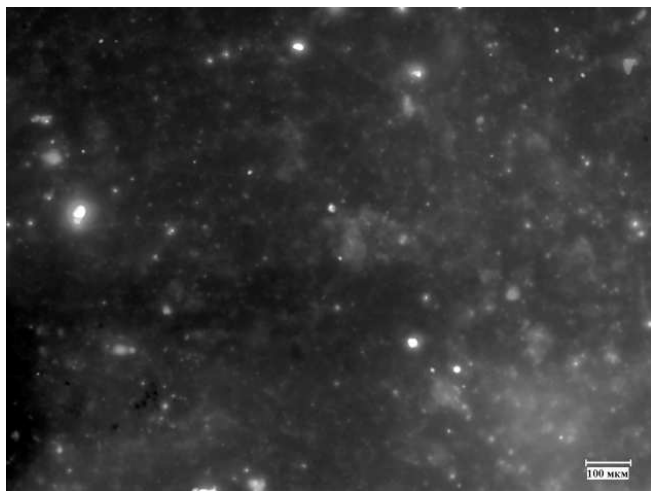


Рис. 5. Фотолюминесцентное изображение плазмы крови, нанесённой на поверхность фотонного кристалла, полученное с помощью конфокального микроскопа при возбуждении ФЛ ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм и с использованием синего светофильтра FSet01. Присутствуют “красные” и “синие” светящиеся точки, соответствующие различным биологическим объектам

ственно от клеток, а не от поверхности подложки. Изображения биологических объектов, представленных на рис. 5 и 6, дают возможность оценить размеры клеток и их форму. При анализе спектров ФЛ от определённых областей объекта можно получить количественную информацию о параметрах вторичного излучения от компонент клетки. В эритроцитах удастся хорошо рассмотреть впадинку в центре клетки. Следует отметить, что при нанесении клеток крови на покровное стекло получить их ФЛ изображение не удаётся. В то же время при использовании ФК в качестве подложки наблюдаемые изображения в свете ФЛ различаются не только по форме, но и своими спектрами.

Таким образом, в данной работе получены следующие результаты.

1. Установлено, что при помещении молекул ДНК на шероховатую золотую подложку с помощью конфокального микроскопа при использовании в качестве возбуждающего излучения ультрафиолет с длиной волны 365 нм удаётся сформировать отчётливое фотолюминесцентное изображение кластеров ДНК в виде нитей длиной в несколько микрометров. При этом наблюдаемая ширина нитей существенно превышает реальный поперечный размер молекул ДНК. Такой результат объясняется предельным разрешением конфокального микроскопа (люминесцентная мода).

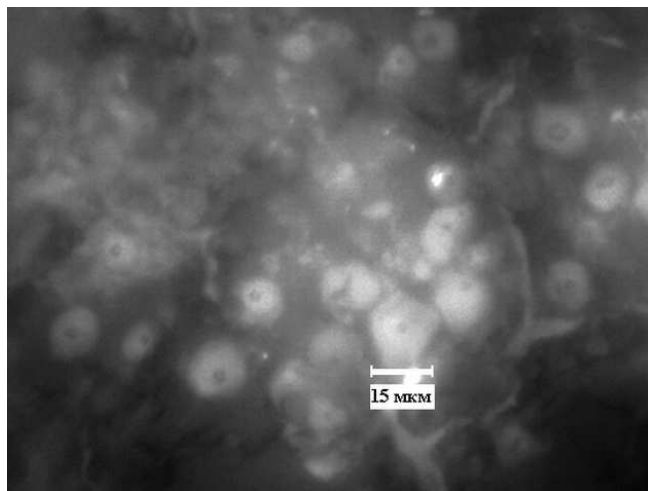


Рис. 6. Фотолюминесцентное изображение эритроцитов, нанесённых на поверхность фотонного кристалла, полученное с помощью конфокального микроскопа при возбуждении ФЛ ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм и с использованием синего светофильтра FSet01

2. Установлено, что при помещении молекул ДНК на наноструктурированную поверхность фотонного кристалла также удаётся сформировать фотолюминесцентное изображение кластеров ДНК с помощью конфокального микроскопа при использовании в качестве возбуждающего излучения ультрафиолет с длиной волны 365 нм. Однако при этом изображение молекул ДНК является размытым и менее интенсивным. Размытие фотолюминесцентного изображения ДНК объясняется “погружением” молекул ДНК в объём ФК через каналы, размер которых близок к 10 нм.

3. Особенностью предложенного метода является тот факт, что с помощью фотонного кристалла можно регистрировать фотолюминесцентное изображение биологических объектов больших размеров (> 1 мкм), которые не “проваливаются” в поры ФК, а также кластеров из большого числа исследуемых молекул, заполняющих весь объём ФК [4]. Таким образом, нами сделан вывод о том, что использование ФК в качестве подложек целесообразно при формировании фотолюминесцентных изображений биологических объектов сравнительно большого размера (клеток, вирусов и т. д.); при этом использование подложек из ФК оказывается существенно более эффективным, чем покровных стекол.

Для дальнейшего развития метода, основанного на использовании в качестве подложек ФК, созданных на основе искусственных опалов, представляется целесообразным получение опалов с меньшим размером

глобул, обеспечивающим соответствующее уменьшение размеров каналов до величин 1 нм. Кроме того, возбуждение ФЛ в нативных ДНК целесообразно проводить с использованием коротковолнового возбуждающего излучения, например: полупроводниковых светодиодов с длиной волны 280 нм или четвертой гармоники лазера YAG:Nd³⁺ с длиной волны генерации 266 нм.

Работа выполнена благодаря финансовой поддержке Украинско-Российского проекта (2012, 2013 гг.), УНТЦ 5525 (2012–2013), а также Украинско-Немецкого проекта №М366 (2011–2012). Кроме того, благодарим за поддержку Министерство образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.513.11.3116), а также Российский фонд фундаментальных исследований (проекты №10-02-00293, 11-02-00164, 11-02-12092).

1. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, edited by J.V. Pawley (Springer, Berlin, 2006).
2. Е.В. Селиванов, *Красители в биологии и медицине: Справочник* (Азбука, Барнаул, 2003).
3. C. Cremer and T. Cremer, *Microscopica Acta* **81**, 31 (1978).
4. V. Boyko, G. Dovbeshko, O. Fesenko V. Gorelik, V. Moiseenko, V. Romanyuk, T. Shvets, and P. Vodolazkyu, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **535**, 30 (2011).
5. P. Vigny and A. Favre, *Photochem. Photobiol.* **20**, 345 (1974).
6. J.P. Morgan and M. Daniels, *Photochem. Photobiol.* **31**, 101 (1980).
7. V.M. Yashchuk, S.M. Yarmoluk, V.Yu. Kudrya, M.Yu. Losytskyu, V.P. Tokar, V.M. Kravchenko, V.B. Kovalska, A.O. Balanda, and D.V. Kryvotenko, *Adv. Opt. Technol.* **2008**, 908246 (2008).
8. R.H. Webb, *Rep. Prog. Phys.* **59**, 427 (1996).
9. *Confocal Microscopy Methods and Protocols*, edited by S. Paddock (Humana Press, Newcastle, 1998).
10. W. Stober, A. Fink, and E. Bohn, *J. Coll. Interface Sci.* **26**, 62 (1968).
11. G.I. Dovbeshko, V.I. Chegel, N.Ya. Gridina, O.P. Repnytska, Y.M. Shirshov, V.P. Tryndiak, I.M. Todor, and G.I. Solyanik, *Biospectroscopy* **67**, 470 (2002).
12. А.Н. Грузинцев, Г.А. Емельченко, В.М. Масалов, М. Романелли, К. Бартхоу, П. Беналул, А. Мэтр, *Неорганические материалы* **44**, 203 (2008).
13. А.Н. Грузинцев, Г.А. Емельченко, В.М. Масалов, Е.Е. Якимов, *Неорганические материалы* **45**, 302 (2009).
14. Y.D. Glinka, S.-H. Lin, and Y.-T. Chen, *Phys. Rev. B* **62**, 4733 (2000).

15. V.S. Gorelik, *Quant. Electronics* **37**, 409 (2007).
16. В.А. Кособукин, *Окно в микромир* **4**, 4 (2002).
17. V. Yashchuk V. Kudrya, M. Losytskyu, H. Suga, and T. Ohul'chanskyu, *J. Mol. Liq.* **127**, 79 (2006).
18. X. Li, Y. Peng, and X. Qu, *Nucleic Acids Res.* **34**, 3670 (2006).
19. Ch. Luo, S.G. Johnson, J.D. Joannopoulos, and J.B. Pendry, *Phys. Rev. B* **68**, 045115 (2003).
20. L. Skuja, *J. Non-Cryst. Solids* **239**, 16 (1998).
21. G.T. Boyd, Z.H. Yu, and Y.R. Shen, *Phys. Rev. B* **33**, 7923 (1986).

Получено 06.10.11

НОВІ ПІДКЛАДКИ, ЩО ПОСИЛЮЮТЬ СИГНАЛИ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ, ДЛЯ ФОРМУВАННЯ ЗОБРАЖЕНЬ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

Г.І. Довбешко, Є.М. Фесенко¹, В.В. Бойко, В.Ф. Горчев, С.О. Карахін, Н.Я. Грідіна, В.С. Горелік, В.Н. Моїсенко

Резюме

В роботі показано можливість використання фотонних кристалів, створених на основі штучних опалів, як підкладок для люмінесцентної мікроскопії біологічних об'єктів. Вивчено просторовий розподіл фотолюмінесценції кластерів ДНК на поверхні опалів і на шорсткуватих золотих підкладках при порушенні ультрафіолетовим випромінюванням з довжиною хвилі 365 нм. На прикладі зразків клітин крові продемонстровано можливість візуалізації біологічних об'єктів при використанні елементів наноструктури штучних опалів у ролі міток і підсилювачів зображення.

NOVEL PHOTOLUMINESCENCE-ENHANCING SUBSTRATES FOR IMAGE FORMATION OF BIOLOGICAL OBJECTS

G.I. Dovbeshko¹, O.M. Fesenko¹, V.V. Boyko¹, V.F. Gorchev², S.O. Karakhin², N.Ya. Gridina³, V.S. Gorelik⁴, V.N. Moiseenko⁵

¹Institute of Physics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine (46, Prosp. Nauky, Kyiv 03028, Ukraine)

²O.V. Paladin Institute of Biochemistry, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine

(9, Leontovych Str., Kyiv 01601, Ukraine)

³A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery, Academy of Medical Science of Ukraine (32, Manuilskyi Str., Kyiv 04050, Ukraine)

⁴P.N. Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences (53, Lenin Ave., Moscow 117924, Russia)

⁵Dnipropetrovsk National University (72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49050, Ukraine)

Summary

The use of photonic crystals, which were fabricated on the basis of synthetic opals, as substrates for the luminescence mi-

croscopy of biological objects has been shown. The spatial distributions of the photoluminescence by DNA clusters excited by 365-nm ultra-violet irradiation on opal surfaces and rough gold substrates have been studied. With the use of blood cells as

an example, a possibility for the visualization of biological objects in the case where the nanostructure elements of synthetic opals are applied as labels and image amplifiers has been demonstrated.