

## Простой светодиодный осветитель для проведения флуоресцентных исследований биологических объектов

*Р. Ш. Яруллов<sup>1</sup>, А.Р. Латфуллин<sup>1</sup>, Н.В. Жиялков<sup>2,3</sup>, Э.Ф. Хазиев<sup>1,2,3</sup>, Д.В. Самигуллин<sup>1,2,3</sup>*

*<sup>1</sup>Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Казань*

*<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук, Казань*

*<sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань*

**Аннотация:** Работа описывает конструкцию простого светодиодного осветителя для проведения флуоресцентных микроскопических исследований биологических объектов. В осветителе в качестве источника света используются сверхъяркие полупроводниковые светодиоды, которые обеспечивают стабильный малощумящий свет. Представленный источник света может использоваться при регистрации флуоресцентных сигналов низкой амплитуды при исследованиях возбудимых клеток, выполненных с использованием кальциевых или потенциал-чувствительных красителей. Осветитель изготовлен из недорогих, легкодоступных компонентов.

**Ключевые слова:** сверхъяркий светодиод, осветитель, флуоресценция, микроскопия.

### Введение

Флуоресцентная микроскопия является мощным инструментом для исследования биологических объектов [1]. В последние годы, в связи с появлением новых флуоресцентных маркеров для окраски внутриклеточных структур и основных сигнальных молекул, включая ионы кальция[2], возможности флуоресцентной микроскопии существенно расширились. В связи с этим к источникам света в флуоресцентном микроскопе стали предъявляться новые требования. Традиционно осветители конструировались на основе ртутных ламп, которые обладают широким спектром излучения. Но одним из существенных недостатков источников освещения на ртутных лампах является высокий уровень собственных

---

шумов, что не позволяет использовать их в исследованиях при регистрации свечения кальциевых или потенциал-чувствительных флуоресцентных красителей. Так же для управления подачей света в системах на базе ртутных ламп необходимо использовать специальные механические заслонки [3]. Многих недостатков осветителей на ртутных лампах лишены монохроматические источники света со стабилизированным питанием, выполненные на ксеноновых лампах. Они обеспечивают малошумящий свет в широком диапазоне длин волн и обеспечивают управление световым потоком за счет акустооптических фильтров [4,5]. Но стоимость таких устройств достаточно высока. Лазерные источники света ограничены по спектру выбранных длин волн, имеют высокую стоимость, и их интеграция в системы освещения микроскопов сопряжена с рядом технических трудностей. В последние годы, благодаря техническим достижениям в области полупроводниковой техники и нанoeлектроники [6,7], стали доступны светодиоды, которые имеют много преимуществ перед традиционными источниками света. Ряд зарубежных производителей осуществляет выпуск осветителей на основе светодиодов [8, 9]. Светодиоды обладают достаточной яркостью и узким спектром излучения. Наличие светодиодов от различных производителей, излучающих на разных длинах волн, позволяет подобрать их для широкого спектра флуоресцентных красителей. Светодиоды обладают малыми собственными шумами и малой инерционностью включения, что позволяет обойтись без дополнительных заслонок и легко управлять световым потоком. Основные достоинства светодиодов — это низкая стоимость и простота конструкции осветителей на их основе. Главным недостатком светодиодов до недавнего времени была их малая мощность излучения. Сейчас же появились достаточно мощные светодиоды, а также светодиодные сборки, которые объединяют несколько диодов в одном корпусе. Перечисленные выше преимущества светодиодов

---

позволяют создавать на базе них осветители для проведения флуоресцентных микроскопических исследований биологических объектов [10]. В данной работе мы описываем конструкцию простого светодиодного осветителя, собранного из доступных компонентов для проведения флуоресцентных микроскопических исследований.

### **Узлы и конструкция осветителя**

Осветитель выполнен в виде единого блока, который включает в себя сборку светодиодов, закрепленную на радиаторе с охладителем, коллектор, нейтральный фильтр, блок питания и стабилизатор тока со схемой управления. В микроскоп свет попадает через оптоволоконно со специальным конденсором (Рис.1).

В ходе обзора доступных светодиодов в качестве источника излучения была выбрана светодиодная сборка LUXEON Rebel LED Blue (470nm/490Lm) фирмы Luxeon Star LEDs, состоящая из 7 светодиодов [11]. Светодиодная сборка допускает работу при токе 350, 700 и 1000 мА. При токе 700 мА сборка обеспечивает излучение достаточной интенсивности. Светодиоды можно подключать к источнику тока последовательно и параллельно. Регулируя количество подключенных светодиодов можно изменять интенсивность свечения. Свет от светодиодов собирается при помощи специального коллектора Polymer Optics 7 LED Cell Cluster Concentrator Optic, так же приобретенного в фирме Luxeon Star LED [12]. Светодиодная сборка закрепляется на радиаторе (например, от процессора компьютера) через теплопроводящую смазку КТП-8 при помощи трех винтов М3. На светодиодную сборку приклеивается коллектор.

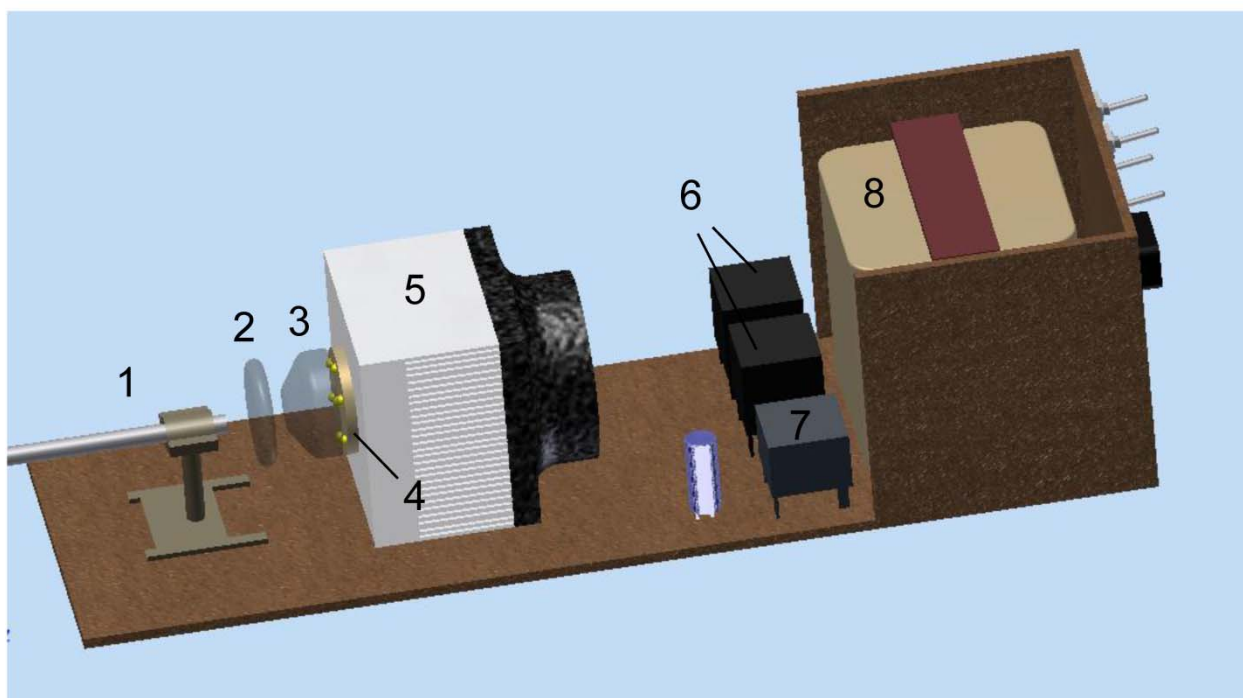


Рис. 1. Конструкция осветителя. 1 – оптоволокну; 2 – нейтральный фильтр; 3 – коллектор; 4 – светодиодная сборка; 5 – радиатор с вентилятором; 6 – регуляторы тока; 7 – выпрямитель; 8 – трансформатор.

Коллектор собирает свет от светодиодов в пучок диаметром 12 мм на расстоянии 25 мм от линзы. В этой точке закрепляется входной торец оптоволокну. Между коллектором и оптоволокну при необходимости можно устанавливать нейтральный фильтр (рис 1) для дополнительной регулировки интенсивности светового потока. Питание осветителя состоит из линейного источника питания и двух регуляторов тока LUXEDRIVE 3021-D-E-700 BuckPuck (Рис. 2). Регуляторы обеспечивают ток 700 мА и имеют специальный вход для коммутации светодиодов. Управление включением светодиодов осуществляется с АЦП или с другого синхронизирующего

устройства TTL импульсом через ключ, собранный на транзисторе кт3107 (Рис. 2). При помощи выключателей подключается необходимое количество светодиодов, от одного до семи, в зависимости от необходимой мощности излучения.

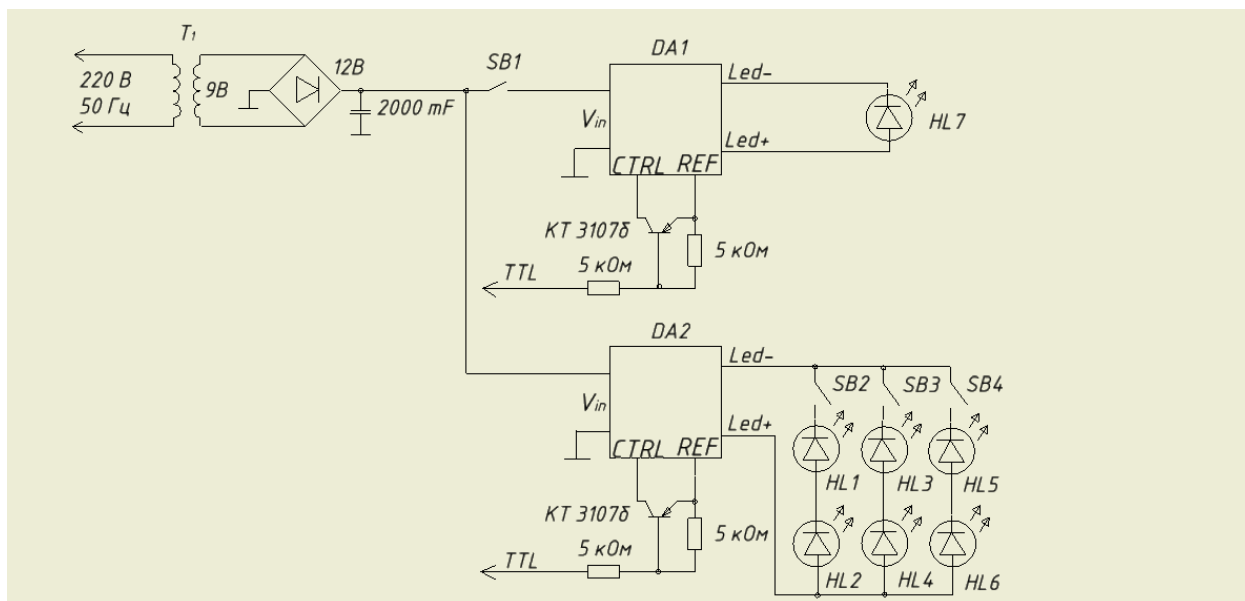


Рис. 2. Принципиальная схема осветителя.

### Заключение

Одно из основных достоинств разработанного осветителя - это простота и дешевизна конструкции. Это выгодно отличает его от конструкции, описанной в работе [10], где используются сложные оптические и электронные компоненты, требующие для изготовления специальных навыков и оборудования. Все элементы описанной конструкции доступны для приобретения в интернет-магазинах [11,12]. Во многих промышленных конструкциях для регулировки яркости светодиодных осветителей используется импульсная модуляция их работы, например в осветителе фирмы Graen [9]. Но такой тип регуляции не подходит при регистрации быстрых флуоресцентных сигналов, например, кальциевого

транзиента [13], длительность которых сравнима с длительностью импульсов модуляции. В описанном осветителе регулировка яркости осуществляется подключением дополнительных диодов или использованием нейтральных фильтров, пропускающих определенный процент светового потока. Это обеспечивает непрерывное освещение препарата светом необходимой интенсивности во время регистрации флуоресценции от образца. В качестве нейтральных фильтров мы использовали фильтры, входящие в комплект флуоресцентного микроскопа, предназначенные для снижения интенсивности света от ртутной лампы осветителя. Используемый светодиод позволяет возбуждать флуоресценцию в голубой зоне спектра на частоте 470 нм. В этой спектральной области возбуждаются наиболее распространённые флуорохромы, например кальциевые флуоресцентные красители [2]. При необходимости можно использовать светодиоды, которые работают на других длинах волн. На сайте производителя Luxeon Star LED доступны светодиоды, покрывающие практически весь спектр возбуждения флуоресцентных красителей [14]. Описанный осветитель используется в нашей лаборатории для возбуждения флуоресценции кальциевых красителей при регистрации кальциевого транзиента в экспериментах на периферических нервных окончаниях млекопитающих и амфибий [15,16].

*Работа частично поддержана грантом: РФФИ № 16-04-01051*

### **Литература**

1. Yuste R., Konnerth A. Imaging in neuroscience and development a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. 854 p.
2. Tsien R.Y. Fluorescent indicators of ion concentrations // Methods Cell Biol. 1989. Vol. 30. pp. 127-156.

3. SmartShutter® Stepper-motor driven shutter URL:  
sutter.com/Flyers/smartshutter\_flyer.pdf - (free access) – Caps. Screen. –  
English Language (accessed: 10.05.2018)
  4. Lambda DG-4 Plus / DG-5 Plus High Speed Wavelength Switcher URL:  
sutter.com/IMAGING/lambdadg4\_frame.html -(free access) – Caps. Screen.  
–English Language (accessed: 10.05.2018)
  5. Polychrome V monochromator URL:  
biotechnologies.ru/catalog/polychromev.html - (free access) – Caps. Screen.  
–English Language. (accessed: 10.05.2018)
  6. Пушкарев В.И., Лянгузов Н.В., Кайдашев Е.М., Низкотемпературный  
термический синтез наностержней оксида цинка из паров цинка без  
катализатора // Инженерный вестник Дона, 2013, №4 URL:  
ivdon.ru/ru/magazine/archive/n4y2013/1884
  7. Жилин Д.А., Лянгузов Н.В., Кайдашев Е.М., УФ фотоприемник на  
основе наностержней и пленок оксида цинка// Инженерный вестник  
Дона, 2013, №4 URL: ivdon.ru/magazine/archive/n4y2013/1883
  8. Lambda TLED / TLED + LED Transmitted Light Source URL:  
sutter.com/IMAGING/lambdatled.html - (free access) – Caps. Screen. –  
English Language (accessed: 10.05.2018)
  9. FLUOLED® 1CFW And 3CFW URL:  
fraen.com/optics/microscopes/products/fluoled-1cfw-and-3cfw/  
-(free access) – Caps. Screen. –English Language (accessed: 10.05.2018)
  10. Хохлов А.А., Шугайло В.В., Кононенко В.В., Колесников С.С.  
Мультиволновой осветитель для микрофотометрических исследований  
одиночных клеток // Научное приборостроение. 2013. том 23(2). с. 112–  
117.
  11. Blue (470nm) LUXEON Rebel LED, Mounted on a 40mm Round 7-Up  
CoolBase - 490 lm @ 700mA URL: luxeonstar.com/blue-7-led-40mm-
-



- round-coolbase-assembly-490lm - (free access) – Caps. Screen. –English Language (accessed: 10.05.2018)
12. Polymer Optics 7 LED Cell Cluster Concentrator Optic URL: [luxeonstar.com/polymer-7-led-cluster-concentrator-optic](http://luxeonstar.com/polymer-7-led-cluster-concentrator-optic) - (free access) – Caps. Screen. –English Language (accessed: 10.05.2018)
13. Samigullin D.V., Khaziev E. F., Zhilyakov N. V., Bukharaeva E. A., & Nikolsky E. E. Loading a Calcium Dye into Frog Nerve Endings Through the Nerve Stump: Calcium Transient Registration in the Frog Neuromuscular Junction // Journal of visualized experiments: JoVE. 2017. (125). e55122, doi: 10.3791/55122.
14. Luxeon Star High Brightness LEDs URL: [luxeonstar.com/](http://luxeonstar.com/) - (free access) – Caps. Screen. –English Language (accessed: 10.05.2018)
15. Samigullin D.V., Khaziev E. F., Zhilyakov N. V., Bukharaeva E. A., & Nikolsky E. E. Calcium Transient Registration in Response to Single Stimulation and During Train of Pulses in Mouse Neuromuscular Junction // BioNanoScience. 2017. Vol. 7(1). pp. 162-166. doi.org/10.1007/s12668-016-0318-6.
16. Khaziev E., Samigullin D., Zhilyakov N., Fatikhov N., Bukharaeva E., Verkhatsky A. & Nikolsky E. Acetylcholine-Induced Inhibition of Presynaptic Calcium Signals and Transmitter Release in the Frog Neuromuscular Junction // Frontiers in Physiology. 2016. Vol. 7(621). doi: 10.3389/fphys.2016.00621.

### References

1. Yuste R., Konnerth A. Imaging in neuroscience and development a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. 854 p.
  2. Tsien R.Y. Methods Cell Biol. 1989. Vol. 30. pp. 127-156.
-



3. SmartShutter® Stepper-motor driven shutter URL:  
[sutter.com/Flyers/smartshutter\\_flyer.pdf](http://sutter.com/Flyers/smartshutter_flyer.pdf). (free access). Caps. Screen.  
English Language (accessed: 10.05.2018)
  4. Lambda DG-4 Plus. DG-5 Plus High Speed Wavelength Switcher URL:  
[sutter.com/IMAGING/lambdadg4\\_frame.html](http://sutter.com/IMAGING/lambdadg4_frame.html). (free access). Caps. Screen.  
–English Language (accessed: 10.05.2018)
  5. Polychrome V monochromator URL:  
[biotechnologies.ru/catalog/polychromev.html](http://biotechnologies.ru/catalog/polychromev.html). (free access). Caps. Screen.  
English Language. (accessed: 10.05.2018)
  6. Pushkariov V.I., Lyanguzov N.V., Kaidashev E.M. Inženernyj vestnik Dona  
(Rus), 2013. №4. URL: [ivdon.ru/ru/magazine/archive/n4y2013/1884](http://ivdon.ru/ru/magazine/archive/n4y2013/1884)
  7. Zhilin D.A., Lyanguzov N.V., Kaidashev E.M. Inženernyj vestnik Dona  
(Rus), 2013. №4. URL: [ivdon.ru/magazine/archive/n4y2013/1883](http://ivdon.ru/magazine/archive/n4y2013/1883)
  8. Lambda TLED. TLED + LED Transmitted Light Source URL:  
[sutter.com/IMAGING/lambdatled.html](http://sutter.com/IMAGING/lambdatled.html). (free access). Caps. Screen. English  
Language (accessed: 10.05.2018)
  9. FLUOLED® 1CFW And 3CFW. URL:  
[fraen.com/optics/microscopes/products/fluoled-1cfw-and-3cfw/](http://fraen.com/optics/microscopes/products/fluoled-1cfw-and-3cfw/) -(free  
access). Caps. Screen. English Language (accessed: 10.05.2018)
  10. Khokhlov A.A., Shugaylo V.V., Kononenko V.V., Kolesnikov S.S.  
Nauchnoye priborostroyeniye. 2013. Vol. 23(2). pp. 112–117.
  11. Blue (470nm) LUXEON Rebel LED, Mounted on a 40mm Round 7-Up  
CoolBase - 490 lm @ 700mA URL: [luxeonstar.com/blue-7-led-40mm-  
round-coolbase-assembly-490lm](http://luxeonstar.com/blue-7-led-40mm-round-coolbase-assembly-490lm). (free access). Caps. Screen. English  
Language (accessed: 10.05.2018)
  12. Polymer Optics 7 LED Cell Cluster Concentrator Optic URL:  
[luxeonstar.com/polymer-7-led-cluster-concentrator-optic](http://luxeonstar.com/polymer-7-led-cluster-concentrator-optic). (free access).  
Caps. Screen. English Language (accessed: 10.05.2018)
-



13. Samigullin D.V., Khaziev E. F., Zhilyakov N. V., Bukharaeva E. A., & Nikolsky E. E. Journal of visualized experiments: JoVE. 2017. (125). e55122, doi: 10.3791/55122.
14. Luxeon Star High Brightness LEDs URL: [luxeonstar.com/](http://luxeonstar.com/) (free access) Caps. Screen. English Language (accessed: 10.05.2018)
15. Samigullin D.V., Khaziev E. F., Zhilyakov N. V., Bukharaeva E. A., & Nikolsky E. E. BioNanoScience. 2017. Vol. 7(1). pp. 162-166. doi.org/10.1007/s12668-016-0318-6.
16. Khaziev E., Samigullin D., Zhilyakov N., Fatikhov N., Bukharaeva E., Verkhatsky A. & Nikolsky E. Frontiers in Physiology. 2016. Vol. 7(621). doi: 10.3389/fphys.2016.00621.