Письма в ЖЭТФ, том 97, вып. 1, с. 56 – 60 © 2013 г. 10 января

Комплексный цилиндрический векторный пучок исключает зависимость интенсивности сканированных флуоресцентных изображений одиночных молекул от ориентации

С. В. Бойченко[1], *Е. Ф. Мартынович*

Иркутский филиал Института лазерной физики СО РАН, 664033 Иркутск, Россия

Поступила в редакцию 22 октября 2012 г.

После переработки 28 ноября 2012 г.

Расчетно-теоретическим путем исследован поляризационно-неоднородный векторный пучок, представляющий собой комплексную суперпозицию радиально и азимутально поляризованного лучей, применительно к сканирующей флуоресцентной микроскопии одиночных молекул. Показано, что его применение позволяет практически исключить зависимость максимального значения интенсивности флуоресцентного сканированного изображения одиночной молекулы от ее ориентации. Продемонстрировано, что сканирование одной горизонтальной плоскости твердотельной матрицы, содержащей примесные люминесцентные молекулы, дает изображения всех молекул, расположенных в слое толщиной 1 мкм, заменяя $3D$-сканирование. Даны рекомендации по технической реализации предлагаемого луча.

DOI: 10.7868/S0370274X13010116

Наблюдение одиночных молекул и других квантовых систем, расположенных на подложках и в средах, методом конфокальной сканирующей люминесцентной микроскопии представляет интерес при проведении исследований в таких научно- технических областях, как химия высокомолекулярных соединений [1], материаловедение [2], фотоника [3], биотехнология и изучение генома [4], медицина [5] и т.д. Большинство квантовых систем, находящихся в изотропной среде, испускает и поглощает свет как дипольные осцилляторы. Во многих приложениях желательно, а в некоторых – необходимо наблюдать все одиночные квантовые системы, независимо от ориентации их дипольных моментов перехода. В связи с этим возникает необходимость визуализации произвольно ориентированных одиночных молекул. Частным случаем здесь является задача визуализации одиночных молекул, находящихся в изотропной среде. В методе сканирующей люминесцентной микроскопии, использующей высокоапертурные объективы, она решается посредством пространственной модуляции электрического вектора светового поля в поперечном сечении возбуждающего луча.

Одно из первых упоминаний о решении подобной задачи содержится в [6]. Однако авторы ставили своей целью наблюдение одиночных молекул различных ориентаций вблизи границы раздела полимера и воздуха, не претендуя на визуализацию произвольно ориентированных молекул, находящихся в изотропной среде, и не предложили эффективного способа их визуализации. Естественным способом решения данной задачи представляется использование радиально поляризованного входного луча, как это делается, например, в [7], либо обобщенного цилиндрического векторного пучка [8]. Эти цилиндрические векторные пучки (ЦВП) в принципе позволяют визуализировать произвольно ориентированные молекулы как в тонких полимерных пленках (толщиной в десятки нм) [7], так и в изотропных средах (например, в полимерных пленках толщиной более 2 мкм) [8, 9]. Но нужно отметить, что хотя различие в интенсивностях изображений минимально и максимально возбуждаемого диполя не препятствует наблюдению их обоих при одинаковых условиях, оно составляет довольно заметную величину. В последнее десятилетие во всем мире активно исследуются и применяются ЦВП в контексте решения указанной задачи. Однако нам не известны работы, где бы целенаправленно изучались лучи, представляющие собой комплексную суперпозицию линейных ЦВП. Тем временем весьма вероятно, что возможности такого луча шире в виду большего числа контролируемо варьируемых параметров. Можно предполагать, что с его помощью удастся сократить упомянутое различие интенсивностей. Наша работа посвящена изучению луча такого типа с целью решения задачи флуоресцентной визуализации произвольно ориентиро-

[1] e-mail: ste89@yandex.ru

ванных молекул в конфокальной сканирующей флуоресцентной микроскопии.

Математический аппарат для расчета конфокальных сканированных флуоресцентных изображений одиночных дипольных излучателей описан в нашей предыдущей работе [9]. Здесь мы приведем основные математические формулы, необходимые для таких расчетов. Электрический вектор светового поля в точке фокального объема, задаваемой радиусом-вектором $\mathbf{r} = (x, y, z)$, вычисляется по формуле [9, 10]

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \frac{-if}{\lambda} \int\limits_0^{\theta_{\max}} \int\limits_0^{2\pi} \sin\theta \sqrt{\cos\theta} \exp\left(-ik\mathbf{nr}\right) \times \\ \times K(\theta, \varphi) \mathbf{E}_0(\theta, \varphi)\, d\theta\, d\varphi, \tag{1}$$

где i – мнимая единица, f – фокусное расстояние микрообъектива, λ – длина волны, k – модуль волнового вектора возбуждающего луча, $\mathbf{n} = (\sin\theta\cos\varphi, \sin\theta\sin\varphi, \cos\theta)$ – нормаль к мнимой сфере, K – трехмерная матрица поворота, $\mathbf{E}_0$ – электрический вектор светового поля входного лазерного луча. Интегрирование ведется по телесному углу, охватываемому объективом: $\theta_{\max}$ – угловая апертура объектива, θ и φ – полярный и азимутальный углы соответственно. Расчеты будут проводиться для объектива с $\theta_{\max} = 64^0$. (В [9] в показателе экспоненты вместо скалярного произведения стоит расстояние между точкой фокального объема и точкой на мнимой сфере, взятое с противоположным знаком. Однако в силу малости характерных значений r (сотни нм) по сравнению с радиусом мнимой сферы (несколько мм) обе формулы дают практически одинаковый результат.) Вероятность возбудить молекулу с дипольным моментом перехода $\mathbf{d} = (\sin\theta_d\cos\varphi_d, \sin\theta_d\sin\varphi_d, \cos\theta_d)$, расположенную в точке с радиусом-вектором $\mathbf{r}$, световым полем $\mathbf{E}$ равна

$$P_{\text{ex}}(\mathbf{r}, \mathbf{d}) \sim |\mathbf{E}(\mathbf{r})\mathbf{d}|^2. \tag{2}$$

Интенсивность в точке конфокального флуоресцентного сканированного изображения, соответствующей точке фокального объема $\mathbf{r}$, в которой находится молекула с дипольным моментом $\mathbf{d}$ составляет

$$I(\mathbf{r}, \mathbf{d}) \sim P_{\text{ex}}(\mathbf{r}, \mathbf{d}) \iint\limits_{\Omega_0} J(\mathbf{d}, \mathbf{n}) T(\theta) \sin\theta\, d\theta\, d\varphi, \tag{3}$$

где Ω_0 – угол, охватываемый объективом, $J(\mathbf{d}, \mathbf{n})$ – интенсивность излучения диполя $\mathbf{d}$ в направлении $\mathbf{n}$ (вид этой функции можно найти в [11]), $T(\theta)$ – функция пропускания объектива и другой собирающей оптики. Логично предположить, что функция пропускания является аксиально-симметричной, т.е. не зависит от угла φ (по крайней мере при качественной реализации собирающей оптики она должна зависеть от φ очень слабо). Принимая этот факт, можно переписать формулу (3) как

$$I(\mathbf{r}, \mathbf{d}) \sim (1 - \alpha\cos 2\theta_d) |\mathbf{E}(\mathbf{r})\mathbf{d}|^2, \tag{4}$$

где α – коэффициент вариации светосбора, зависящий от угловой апертуры объектива и функции пропускания оптики. Для объектива с $\theta_{\max} = 64^0$ (такие объективы входят в комплект, например, к микроскопу MicroTime 200, PicoQuant, GmbH) при $T(\theta) = 1$ имеем $\alpha = 0.25$. В общем случае значения этого коэффициента не могут лежать за пределами интервала от $-1/3$ до 1.

Как уже упоминалось выше, данная работа посвящена теоретическому изучению, комплексного ЦВП с целью визуализации с его помощью произвольно ориентированных молекул, находящихся в изотропной среде. Зададим распределение электрического вектора светового поля в сечении исследуемого луча следующим образом:

$$\mathbf{E}_0(\theta, \varphi) = \mathbf{E}_r(\varphi) + A\exp(i\Phi)\mathbf{E}_\varphi(\varphi), \tag{5}$$

где $\mathbf{E}_r(\varphi) = (\cos\varphi, \sin\varphi)$, $\mathbf{E}_\varphi(\varphi) = (-\sin\varphi, \cos\varphi)$ – векторы радиальной и азимутальной поляризации, φ – угол полярной системы координат в поперечном сечении луча, A и Φ – варьируемые параметры эллиптичности. Варьируя первый параметр от 0 до ∞, а второй – от 0 до 2π, мы охватим все возможные комплексные суперпозиции радиальной и азимутальной поляризаций. В качестве параметра эффективности ε будем использовать отношение максимального значения интенсивности на конфокальном сканированном изображении минимально возбуждаемого диполя к аналогичному значению для максимально возбуждаемого диполя (диполи лежат в одной плоскости, которая совпадает с фокальной) [9]:

$$\varepsilon = \frac{\max(I_{\min\,\text{ex}})}{\max(I_{\max.\,\text{ex}})}. \tag{6}$$

Задача нашего исследования заключается в том, чтобы изучить зависимость ε от A и Φ и найти его максимально достижимое значение.

Результаты исследования зависимости ε от параметров A и Φ при $\alpha = 0.25$ представлены на рис. 1. Участок с $\Phi = 180^0$–360^0 на рисунке не приведен, так как по данным численного анализа выполняется условие периодичности: $\varepsilon(A, \Phi + \pi) = \varepsilon(A, \Phi)$. Очевидно, что при $A \to \infty$ ε спадает до 0 (луч становится азимутально поляризованным, а для такого луча

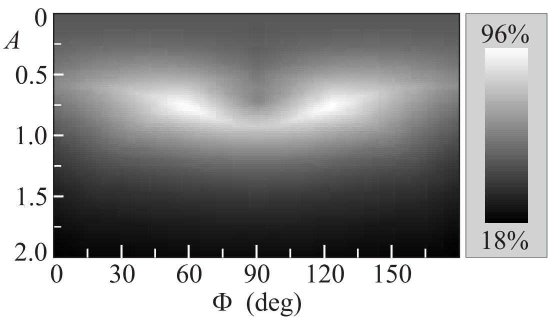

Рис. 1. Зависимость параметра эффективности ε от параметров эллиптичности (значение ε в заданной точке отображается яркостью)

$\varepsilon = 0$). Это дает основания считать, что при $A > 2$ ε не принимает значений, превышающих 20%, и максимально достижимое его значение лежит в пределах области, приведенной на рис. 1. Свое максимальное значение исследуемая функция принимает при $A = 0.76$, $\Phi = 57.5^0$ и 122.5^0. Оно составляет 96%, т.е. практически достигает предельно возможной величины (100%). В этих условиях для радиального поля $\varepsilon = 45\%$, для обобщенного цилиндрического векторного пучка и для радиального пучка с оптимальным диаметром $\varepsilon = 60\%$, а для циркулярно неоднородного пучка $\varepsilon = 47\%$ (т.е. значительно меньше).

Проведем оценку вычислительной ошибки в определении ε. В данной работе нами применялась формула (4) при $z = 0$ (фокальная плоскость). Значение ε при фиксированных A и Φ вычислялось следующим образом. Пространство четырех переменных $(x, y, \theta_d, \varphi_d)$ сканировалось с заданным шагом по каждой переменной $(dx, dy, d\theta_d, d\varphi_d)$ на промежутках -1–1 мкм, -1–1 мкм, 0–π, 0–2π соответственно. В каждой точке этого пространства вычислялась функция (4). Затем находились величины $I_{\text{max.ex}}$ (как наибольшее значение функции (4)) и $I_{\text{min.ex}}$ (как наибольшее значение максимума по координатам и минимума по углам функции (4)). После этого бралось их отношение (6). Очевидно, что относительная ошибка вычислений $I_{\text{max.ex}}$ и $I_{\text{min.ex}}$, вызванная дискретностью сканирования, не превосходит величины

$$\frac{1}{I}\left(\left|\frac{\partial I}{\partial x}dx\right| + \left|\frac{\partial I}{\partial y}dy\right| + \left|\frac{\partial I}{\partial \theta_d}d\theta_d\right| + \left|\frac{\partial I}{\partial \varphi_d}d\varphi_d\right|\right). \quad (7)$$

Значения производных и функции I берутся в точках, соответствующих $I_{\text{max.ex}}$ и $I_{\text{min.ex}}$. Вычисления показали, что в нашем расчете величина (7) не превосходит 0.2%. Машинная точность вычисления самих $I_{\text{max.ex}}$ и $I_{\text{min.ex}}$ в заданной точке составляет порядка 0.1%. Таким образом, можно надежно утверждать, что вычислительная ошибка в определении ε не превышает 1% (в предположении, что формула (1) дает точный результат). Это дает уверенность в том, что найденное значение ε составляет не менее 95%.

Вместе с тем результат $\varepsilon = 96\%$ получился для $\alpha = 0.25$, что, в свою очередь, выполняется при $T(\theta) = 1$ (см. (4) и (3)). Тем временем более вероятно, что функция $T(\theta)$ максимальна на оси объектива и медленно спадает к краям. Это означает, что коэффициент α, возможно, принимает значение, большее 0.25. Следовательно, имеет смысл изучить зависимость максимально достижимого значения ε от α. Эта зависимость представлена на рис. 2. При заданном значении параметра α подбирались параметры A и Φ, максимизирующие функцию ε. Как упоминалось выше, $\alpha \in (-1/3, 1)$. Участок $\alpha \in (-1/3, 0.25)$ фактически не представляет практического интереса, поскольку в условиях эксперимента такие значения маловероятны. Поэтому он приведен не полностью (приведенная часть интересна лишь с математической точки зрения). Положительный эффект заключается в том, что до $\alpha = 0.5$ функция ведет себя довольно стабильно и все ее значения на данном участке превосходят 80%. Быстрое убывание функции начинается при $\alpha = 0.5$. Чтобы было достигнуто значение $\alpha = 0.5$, функция $T(\theta)$ должна заметно отличаться от 1 и быть достаточно быстро убывающей. Этого вполне можно избежать при качественной реализации оптики. Следовательно, незначительные несовершенства собирающей оптики не должны привести к заметному снижению параметра эффективности.

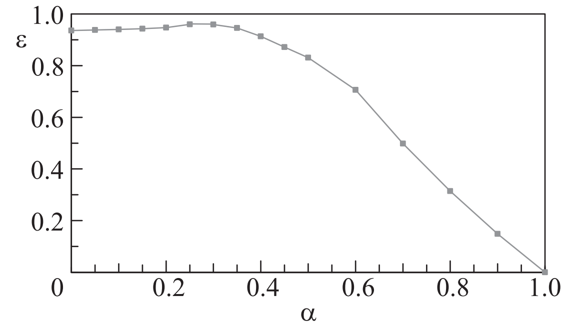

Рис. 2. Зависимость параметра эффективности от коэффициента вариации светосбора

Практический интерес представляет также зависимость интенсивности изображений максимально и минимально возбуждаемых диполей от z-координаты. Для некоторых приложений ценен случай, когда максимум интенсивности на изображении не зависит от ориентации и зависит от z-координаты одиночного эмиттера. На рис. 3 приведена зависимость от

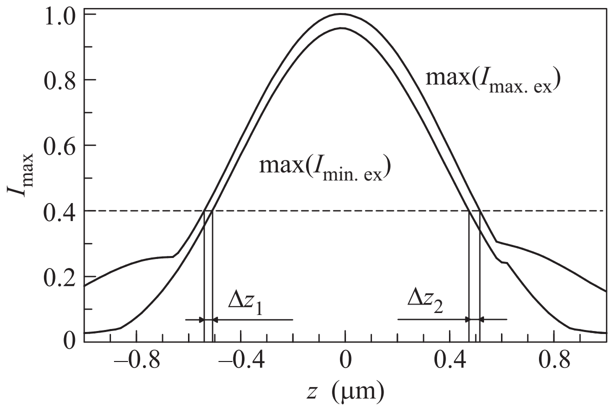

Рис. 3. Зависимость максимумов интенсивности на сканированных изображениях для минимально и максимально возбуждаемых диполей от координаты z

z максимума интенсивности на сканированном изображении максимально и минимально возбуждаемых эмиттеров, находящихся в плоскости с координатой z, для описанного выше луча. Начало отсчета, как и ранее, принято в геометрическом фокусе. Из графиков видно, что при значениях z из диапазона от -0.5 до 0.5 мкм максимум интенсивности заметно зависит от z и слабо – от ориентации. Это дает принципиальную возможность собрать всю информацию (такую, как время затухания люминесценции, взаимное расположение эмиттеров, мерцающий характер люминесценции и т.д.) об эмиттерах, находящихся в слое толщиной 1 мкм, сделав плоское сканированное изображение одной горизонтальной плоскости вместо объемного сканированного изображения всего слоя. Этого можно добиться, например, следующим образом. 1. Провести между $\max(I_{\mathrm{max.ex}})$ и $\max(I_{\mathrm{min.ex}})$ среднюю линию. 2. Найти координаты z_1 и z_2 точек ее пересечения с горизонтальной прямой, проведенной на уровне 0.4 (сигнал с интенсивностью 40% от максимального должен быть вполне детектируемым) ($z_1 \sim -0.5$ мкм; $z_2 \sim 0.5$ мкм). 3. В эксперименте сначала сделать предварительное плоское сканированное изображение и найти максимум интенсивности по z для какого-то одного эмиттера, сделав его $3D$-скан, а затем получить "беловое" горизонтальное изображение при данном z и отнормировать его на максимум этого эмиттера. 4. Исключить эмиттеры, нормированный максимум интенсивности которых составляет менее 0.4. Тогда можно полагать, что оставшиеся изображения связаны с эмиттерами, лежащими в слое z_1–z_2. Проблема с определением принадлежности эмиттера данному слою может возникнуть только в случае, если он попадет в один из приграничных слоев, Δz_1 или Δz_2 (Δz_1, $\Delta z_2 \sim 0.04$ мкм), и интенсивность его изображения будет близка к 0.4. Однако, во-первых, вероятность нахождения эмиттера в приграничном слое при условии, что он попал в исследуемый слой микронной толщины, при равномерном распределении эмиттеров в матрице не превышает 8%. А во-вторых, по распределению интенсивности на изображении мы теоретически можем оценить ориентацию эмиттера, понять, насколько эффективно он возбуждается, и определить, принадлежит ли он слою z_1–z_2, решив указанную проблему. Важно также, что z_1, z_2, Δz_1 и Δz_2 практически не зависят от ориентации эмиттера, выбранного на третьем шаге, ввиду быстрого убывания функции при $z = \pm 0.5$. По временны́м затратам описанная работа применительно к слою микронной толщины и ширины в несколько десятков мкм значительно меньше, чем его полное $3D$-сканирование.

Определим, как технически можно генерировать пучок вида (5). Одним из вариантов является применение жидкокристаллических конверторов поляризации светового поля, способных преобразовывать линейно поляризованные лазерные лучи в лучи с практически любой пространственно неоднородной поляризацией. Одно из устройств такого типа описано в [12]. Недостатком жидкокристаллических конверторов может оказаться лишь их высокая стоимость. Альтернативу им в данном случае могут составить более простые конверторы для генерации ЦВП из линейно поляризованных лучей (CVB-конверторы) в сочетании с четвертьволновой двулучепреломляющей пластинкой. В качестве CVB-конверторов могут выступать пластины с пространственно неоднородным наведенным двулучепреломлением [13] и конверторы на основе жидкокристаллических полимеров [14]. Также заслуживают внимания многосекторные пластинки с естественным двулучепреломлением [15], хотя они способны дать лишь приближенное по отношению к (5) распределение.

Рассмотрим, как может быть осуществлена генерация луча с помощью CVB-конвертора и четвертьволновой пластинки. Их матрицы Джонса можно представить в следующем виде:

$$J_{\mathrm{CVB}} = \begin{pmatrix} \cos\varphi & \sin\varphi \\ \sin\varphi & -\cos\varphi \end{pmatrix}, \tag{8}$$

$$J_{\lambda/4} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 + i\cos 2\gamma & i\sin 2\gamma \\ i\sin 2\gamma & 1 - i\cos 2\gamma \end{pmatrix}, \tag{9}$$

где φ – азимутальный угол в сечении луча, γ – угол между быстрой осью четвертьволновой пластинки и осью x в заданной системе координат в сечении луча. Если мы пропустим луч с поляризацией $\mathbf{E}_0 = (\cos\beta, \sin\beta)$ сначала сквозь пластинку (9), а затем сквозь конвертор (8), то его поле примет вид

$$\mathbf{E}'_0 = J_{\mathrm{CVB}} J_{\lambda/4} \mathbf{E}_0 = Z_1[\mathbf{E}_r + A\exp(i\Phi)\mathbf{E}_\varphi], \quad (10)$$

где Z_1 – общий комплексный множитель, а A и Φ являются функциями углов α и β. При заданных A и Φ углы γ и β определяются следующим образом:

$$\tan 2\gamma = \frac{2A\cos\Phi}{A^2 - 1}, \quad (11)$$

$$\tan\beta = \frac{A(\cos\Phi - \sin\Phi\cos 2\gamma)}{A\sin\Phi\sin 2\gamma - 1}, \quad (12)$$

т.е. задавая углы γ и β, мы можем получить нужный пучок вида (5). Расчет показал, что при использовании в качестве CVB-конвертора 8-сегментной полуволновой пластинки, рассмотренной в [15], световое поле в фокальном объеме отличается от аналогичного поля для идеального конвертора не более чем на 5%, а соответствующие кривые получаются практически такими же как на рис. 3. Это означает, что теоретически данный упрощенный конвертор вполне способен заменить идеальный при более простой технической реализации. Вероятно, это позволит именно ему войти в употребление.

Итак, в настоящей работе, нами расчетным путем впервые найдено распределение светового поля в сечении возбуждающего лазерного луча в схеме сканирующего конфокального флуоресцентного микроскопа, позволяющее исключить зависимость максимального значения интенсивности на изображении одиночной молекулы от ее ориентации. Данная схема наблюдения одиночных молекул позволяет зарегистрировать изображения всех молекул, находящихся в слое толщиной до 1 мкм, сделав скан одной горизонтальной плоскости вместо $3D$-сканирования, требующего бóльших временных затрат. Легко осуществимая технически адаптация параметров эллиптичности возбуждающего луча к свойствам собирающей оптики делает схему предельно эффективной даже при некотором отклонении этих свойств от идеальных.

Работа выполнена по программам ОФН РАН (проект # III.9.3) и СО РАН – НАН Беларуси (проект # 13).

1. Е. В. Ануфриева, Т. Д. Ананьева, Т. Н. Некрасова и др., Высокомол. соединения А **53**, 674 (2011).
2. A. M. Chizhik, R. Jäger, A. I. Chizhik et al., PCCP **13**, 1722 (2011).
3. C. Toninelly, K. Early, J. Bremy et al., Opt. Express **18**, 6577 (2010).
4. S. Brakmann, Nature **464**, 987 (2010).
5. D. Jiang, L. Wang, and W. Jiang, Anal. Chim. Acta **634**, 83 (2009).
6. B. Sick, B. Hecht, and L. Novotny, Phys. Rev. Lett. **85**, 4482 (2000).
7. H. Ishitobi, I. Nakamura, N. Hoyazawa et al., J. Phys. Chem. B **114**, 2565 (2010).
8. H. Wang, S. Chang, L. Lin et al., Optik **122**, 773 (2011).
9. С. В. Бойченко, Е. Ф. Мартынович, Письма в ЖТФ **38**, 72 (2012).
10. B. Richards and E. Wolf, Proc. R. Soc. London Ser. A **253**, 349 (1959).
11. J. D. Jackson, *Classical electrodynamics*, John Willey & Sons, Inc., N.Y.–London, 1962.
12. M. R. Beversluis, L. Novotny, and S. J. Stranick, Opt. express **14**, 2650 (2006).
13. A. Spilman and T. Brown, *US Patent Application Publication 2007/0115551 A1*, G02B 5/30, 2007.
14. S. C. McEldowney, D. M. Shemo, and R. A. Chipman, Opt. express **16**, 7295 (2008).
15. G. Machavariani, Y. Lumer, I. Moshe et al., Opt. Lett. **32**, 1468 (2007).