

07;12

Модернизация люминесцентного сканирующего конфокального микроскопа для наблюдения единичных квантовых систем с произвольной ориентацией

© С.В. Бойченко, Е.Ф. Мартынович

Иркутский филиал Института лазерной физики СО РАН
E-mail: ste89@yandex.ru

Поступило в Редакцию 8 ноября 2011 г.

Предлагается распределение светового поля возбуждающего лазерного луча, входящего в объектив люминесцентного конфокального сканирующего микроскопа, при котором сфокусированный лазерный луч в процессе сканирования изображений способен возбуждать все поглощающие диполи произвольной ориентации примерно с одинаковой эффективностью. Показано расчетным путем, что при сканировании отношение максимальных интенсивностей наименее и наиболее удачно ориентированных диполей составляет 47%. Проводится аналогичный расчет для других распределений светового поля на входе, и их эффективность сравнивается с эффективностью предлагаемого поля.

В некоторых приложениях возникает необходимость возбуждать свечение всех люминесцирующих частиц, находящихся на исследуемом участке. Одним из наиболее важных приложений такого рода является подсчет люминесцентных меток в медико-биологических [1] и геномных [2] исследованиях. К числу эффективных методов определения следовых концентраций примесных атомов, молекул и точечных дефектов относится метод прямого подсчета их числа с помощью конфокальной люминесцентной сканирующей микроскопии [3]. Многие квантовые системы (молекулы, центры окраски и др.) поглощают и испускают свет как дипольные осцилляторы. Следовательно, в данном случае возникает необходимость возбуждать центры свечения с произвольной ориентацией дипольного момента перехода. Наша работа посвящена расчету устройства, преобразующего световое поле лазерного луча

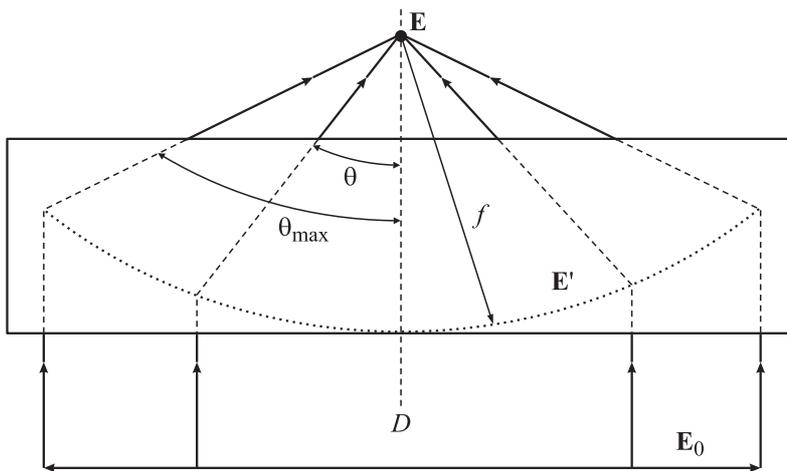


Рис. 1. Оптическая схема объектива конфокального микроскопа. К расчету поля в фокальном объеме.

перед входом в объектив конфокального микроскопа таким образом, чтобы в фокальной плоскости в процессе сканирования эффективно возбуждались электрические диполи произвольной ориентации.

Определим связь между световым полем лазерного луча, входящего в объектив конфокального микроскопа, и полем в фокальном объеме. Оптическая схема, для которой производится расчет, приведена на рис. 1. В объектив конфокального микроскопа (изображенный в виде прямоугольника) подается цилиндрический лазерный луч диаметром D с плоским волновым фронтом. Предполагается, что объектив удовлетворяет условию синусов [4], т.е. поверхностью пересечения входного и выходного лучей является мнимая сфера радиуса f (f — фокусное расстояние объектива). Вследствие этого амплитуды колебаний электрического вектора $\mathbf{E}_0(\theta, \varphi)$ входной плоской световой волны и аналогичного вектора $\mathbf{E}'(\theta, \varphi)$ сферической волны на выходе из объектива связаны соотношением

$$E'(\theta, \varphi) = E_0(\theta, \varphi)\sqrt{\cos\theta}, \quad (1)$$

θ и φ — полярный и азимутальный углы, задающие координаты точки на мнимой сфере пересечения входного и выходного лучей. Поле в

фокальном объеме $\mathbf{E}(x, y, z)$ вычисляется в соответствии с принципом Гюйгенса–Френеля по следующей формуле [5]:

$$\mathbf{E}(x, y, z) = A \int_0^{\theta_{\max}} \int_0^{2\pi} \sin \theta e^{ikS(\theta, \varphi; x, y, z)} \mathbf{E}'(\theta, \varphi) d\theta d\varphi, \quad (2)$$

A — постоянная, θ_{\max} — апертурный угол объектива, x, y и z — координаты точки фокального объема (начало отсчета принято в геометрическом фокусе объектива). S представляет собой расстояние между точкой на мнимой сфере и точкой в фокальном объеме:

$$S(\theta, \varphi; x, y, z) = \sqrt{f^2 - 2f [\sin \theta (x \cos \varphi + y \sin \varphi) + z \cos \theta] + x^2 + y^2 + z^2}. \quad (3)$$

Направляющий вектор напряженности $\mathbf{E}(\theta, \varphi)$ получается из направляющего вектора напряженности $\mathbf{E}_0(\theta, \varphi)$ посредством поворота, задаваемого матрицей:

$$\hat{K}(\theta, \varphi) = \begin{pmatrix} \cos \theta \cos^2 \varphi + \sin^2 \varphi & \sin \varphi \cos \varphi (\cos \theta - 1) & -\sin \theta \cos \varphi \\ \sin \varphi \cos \varphi (\cos \theta - 1) & \cos \theta \sin^2 \varphi + \cos^2 \varphi & -\sin \theta \sin \varphi \\ \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \end{pmatrix}. \quad (4)$$

Таким образом, учитывая соотношение (1), можем записать:

$$\mathbf{E}'(\theta, \varphi) = \hat{K}(\theta, \varphi) \mathbf{E}_0(\theta, \varphi) \sqrt{\cos \theta}. \quad (5)$$

На основании (5) и (2) находим связь между распределением светового поля в фокальном объеме $\mathbf{E}(x, y, z)$ и полем входного луча $\mathbf{E}_0(\theta, \varphi)$:

$$\mathbf{E}(x, y, z) = A \int_0^{\theta_{\max}} \int_0^{2\pi} \sin \theta \sqrt{\cos \theta} e^{ikS(\theta, \varphi; x, y, z)} \hat{K}(\theta, \varphi) \mathbf{E}_0(\theta, \varphi) d\theta d\varphi. \quad (6)$$

Теперь, задавая распределение поля во входном луче, мы можем менять поле в фокальном объеме желаемым образом. Все дальнейшие расчеты проводятся для объектива $60\times$, $NA = 1.2$ (UPlanSApo, водно-иммерсионный), $\theta_{\max} = 1.12$, $f = 4.8$ mm, возбуждение — 530 nm.

Как упоминалось выше, наша цель состоит в том, чтобы в процессе сканирования эффективно возбуждались электрические диполи произвольной ориентации. Следовательно, требуется сделать распределение светового поля в фокальной плоскости таким, чтобы максимальные значения интенсивности люминесценции исследуемых центров не зависели (или по крайней мере зависели слабо) от ориентации излучающих и поглощающих диполей. Мы будем считать, что выполняется приближение Франка–Кондона [6], т.е. излучающий и поглощающий диполи сонаправлены. Вероятность возбуждения диполя, определяемого единичным вектором \mathbf{d} , расположенного в точке (x, y) фокальной плоскости, определяется выражением [7]:

$$P_{ex}(x, y; \theta_d, \varphi_d) \propto |\mathbf{E}(x, y, 0)\mathbf{d}(\theta_d, \varphi_d)|^2, \quad (7)$$

θ_d, φ_d — углы, задающие направление \mathbf{d} . Интенсивность люминесценции такого диполя в конфокальной схеме при сканировании дается формулой:

$$I(\theta_d, \varphi_d; x, y) \propto P_{ex}(x, y; \theta_d, \varphi_d) \iint_{\Omega_0} J(\theta_d, \varphi_d; x, y; \theta, \varphi) \sin \theta d\theta d\varphi, \quad (8)$$

Ω_0 — телесный угол, охватываемый объективом, J — интенсивность излучения диполя в направлении наблюдения (θ, φ) . Так как размеры фокального объема (области, где $\mathbf{E}(x, y, z)$ отличается от нуля) меньше параметра f на 3 порядка, мы пренебрегаем зависимостью J от линейных координат. Интегрируя по Ω_0 , получаем:

$$I(\theta_d, \varphi_d; x, y) \propto (1 - 0.25 \cos 2\theta_d) |\mathbf{E}(x, y, 0)\mathbf{d}(\theta_d, \varphi_d)|^2. \quad (9)$$

Теперь нужно найти распределение $\mathbf{E}_0(\theta, \varphi)$, при котором максимальное по x и y значение $I(\theta_d, \varphi_d; x, y)$ является медленно меняющейся функцией ориентации диполя.

Прямой путь решения поставленной задачи заключается в том, чтобы: 1) найти поле $\mathbf{E}(x, y, 0)$, дающее одинаковые максимальные значения $I(\theta_d, \varphi_d; x, y)$ для любых (θ_d, φ_d) ; 2) найти $\mathbf{E}(\theta, \varphi)$, зная $\mathbf{E}(x, y, 0)$ по формуле, обратной (6). Этот путь имеет два существенных недостатка: во-первых, это сложная математическая задача, а во-вторых, функция $\mathbf{E}_0(\theta, \varphi)$, найденная таким образом, может оказаться чрезмерно

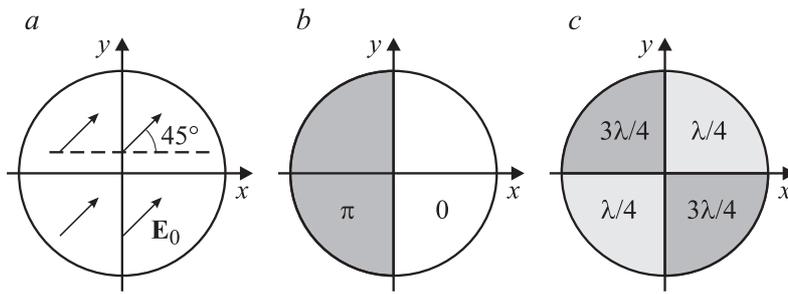


Рис. 2. *a* — поле в поперечном сечении лазерного луча, входящего в объектив конфокального микроскопа, до преобразования. *b, c* — компоненты устройства, преобразующего поле \mathbf{E}_0 в поле (10). Компоненты устройства ставятся последовательно на пути луча.

сложной для технической реализации. Поэтому мы отказались от него и выбрали другой, менее строгий, но более простой и действенный путь: перебор с изучением эффективности легко реализуемых и при этом способных из общих соображений дать желаемый результат распределений $\mathbf{E}_0(\theta, \varphi)$.

Наилучшего результата удалось добиться для радиально-поляризованного света [8] и неоднородного циркулярно-поляризованного, предложенного нами:

$$\mathbf{E}_0^{ic}(\theta, \varphi) = C \begin{pmatrix} \text{sgn}(\cos \varphi) \\ i \text{sgn}(\sin \varphi) \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (10)$$

Одно из возможных устройств для технической реализации распределения (10) приведено на рис. 2. Оно состоит из оптически однородной фазовой пластинки (рис. 1, *b*) и пластинки из положительного двулучепреломляющего кристалла с главной плоскостью, нормальной плоскости рисунка и направленной по оси x (рис. 1, *c*). Поле лазерного луча до преобразования линейно-поляризовано (рис. 1, *a*) и равно $\mathbf{E}_0 e^{i\omega t}$, где ω — частота лазерного излучения; амплитуда поля неизменна в пределах сечения луча. После преобразования получается поле (10) с $C = E_0/\sqrt{2}$.

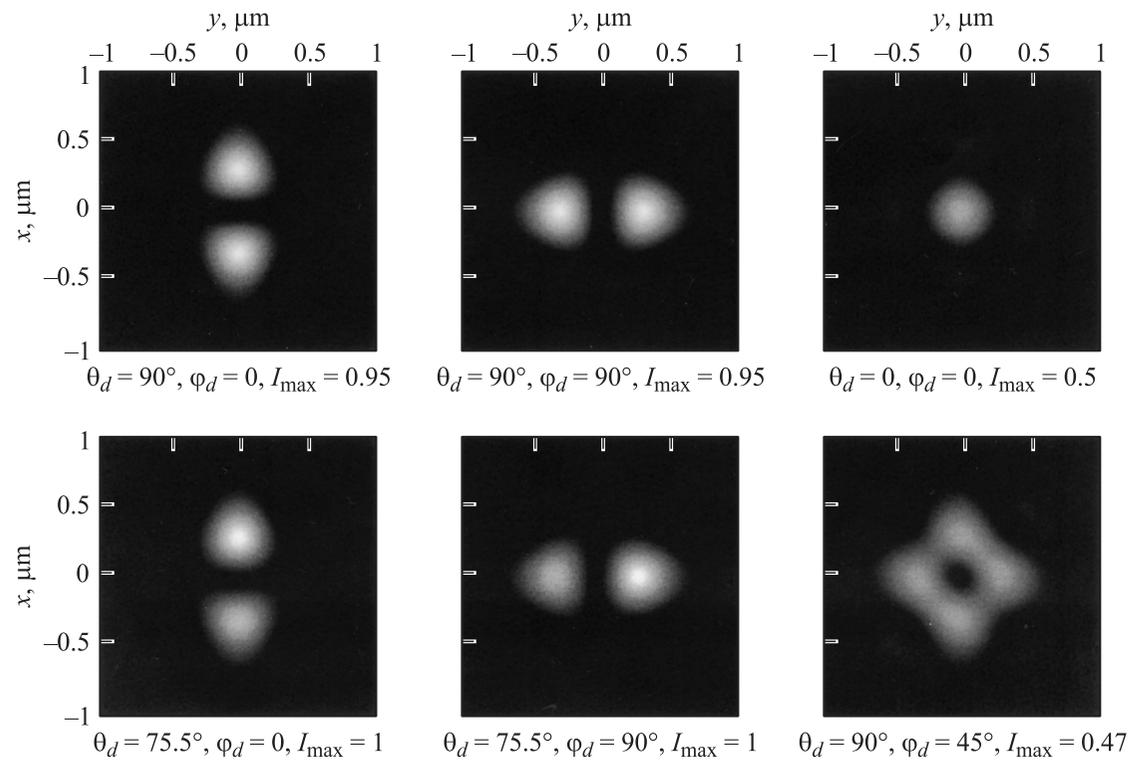


Рис. 3. Рассчитанные конфокальные люминесцентные сканированные изображения центров с различной ориентацией дипольных моментов перехода. Интенсивность в максимумах I_{\max} дана в условных единицах.

Рассчитанные люминесцентные сканированные изображения центров с различной ориентацией дипольных моментов перехода приведены на рис. 3. Диполи с ориентацией $(75.5^\circ, 0)$ и $(75.5^\circ, 90^\circ)$ обладают самой высокой интенсивностью в максимуме, которая достигается в данной схеме построения изображений, т.е. принадлежат к числу диполей, ориентированных наиболее удачно. На рис. 3 интенсивность в их максимумах принята за единицу, и все изображения нормированы по ней. В качестве примера наименее удачно ориентированного диполя приведен диполь с ориентацией $(90^\circ, 45^\circ)$. Введем параметр ε , характеризующий эффективность схемы построения изображений, определяемый как отношение максимальных интенсивностей наименее и наиболее удачно ориентированных диполей. В данном случае $\varepsilon = 47\%$. Отметим, что сканированные изображения диполей, ориентированных по $x(90^\circ, 0)$, по $y(90^\circ, 90^\circ)$ и по $z(0, 0)$, с точностью до коэффициентов совпадают с распределениями интенсивностей $I_x(x, y) = |E_x(x, y, 0)|^2$, $I_y(x, y) = |E_y(x, y, 0)|^2$ и $I_z(x, y) = |E_z(x, y, 0)|^2$, соответственно. Стоит отметить, что, получая экспериментально подобные изображения, можно определять ориентацию дипольного момента перехода [9].

В таблице приведены параметры, характеризующие световое поле в фокальной плоскости, для различных распределений поля на входе. Как говорилось выше, наибольшие значения характеристики эффективности наблюдения ε получаются для поля (10) и радиально-поляризованного света. Причем для радиальной поляризации значение этого параметра больше, чем для поля (10), и менее заметны вторичные максимумы (здесь мы не описываем этот эффект количественно). Однако изображения для радиальной поляризации получаются более широкими. Нужно также иметь в виду, что радиально-поляризованный свет более сложен в технической реализации, чем поле (10).

Таким образом, нами предложено и теоретически обосновано сравнительно простое в технической реализации и вместе с тем достаточно эффективное устройство, с помощью которого можно наблюдать одиночные квантовые системы, излучающие и поглощающие как дипольные осцилляторы, с произвольной ориентацией дипольного момента перехода. Также с помощью этого устройства можно определять ориентацию дипольного момента перехода изолированных дипольных излучателей, что может найти применение не только в медицине и биологии, но и в таких научных направлениях, как квантовая оптика [10], фотоника и материаловедение.

Зависимость распределения поля в фокальной плоскости от распределения поля во входном лазерном луче

Распределение светового поля на входе	Компонента светового поля в фокальной плоскости	Характеристики светового поля в фокальной плоскости						
		Кол-во максимумов	Положение максимумов, μm		FWHM, μm		Максимальная интенсивность, нормированная по I_x	$\varepsilon, \%$
			x	y	Δx	Δy		
Поле (10) — неоднородно циркулярно-поляризованный свет	$I_x(x, y)$	2	0.24 -0.24	0	0.29	0.30	1	47
	$I_y(x, y)$	2	0	0.24 -0.24	0.30	0.29	1	
	$I_z(x, y)$	1	0	0	0.27	0.27	0.9	
Радиально-поляризованный свет, диаметр входного луча 7.6 mm	$I_x(x, y)$	2	0.26 -0.26	0	0.28	0.44	1	60
	$I_y(x, y)$	2	0	0.26 -0.26	0.44	0.28	1	
	$I_z(x, y)$	1	0	0	0.32	0.32	1.7	
Свет линейно-поляризованный в направлении x	$I_x(x, y)$	1	0	0	0.32		1	0.3
	$I_y(x, y)$	Пренебрежимо мала					0.005	
	$I_z(x, y)$	2	0.22 -0.22	0	0.22	0.36	0.15	
Свет циркулярно-поляризованный по x и y	$I_x(x, y)$	1	0	0	0.32		1	9
	$I_y(x, y)$ $I_z(x, y)$	∞	Кольцо радиуса 0.22 μm		0.22		0.15	

Исследование выполнено по программам ОФН РАН (проект ОФН III.9.7.1) и СО РАН–НАН Беларуси (проект № 16).

Список литературы

- [1] *Jiang D., Wang L., Jiang W.* // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 634. N 1. P. 83–88.
- [2] *Margulies M., Egholm M., Altman W.E.* et al. // *Nature.* 2005. V. 437. N 7057. P. 376–380.
- [3] *Бойченко С.В., Войтович А.П., Мартынович Е.Ф.* и др. // *Изв. вузов. Физика.* 2011. Т. 54. № 2/2. С. 86–90.
- [4] *Борн М., Вольф Э.* Основы оптики. М.: Наука, 1973. С. 165. (*Born M., Volf E.* Principles of optics. Oxford: Pergamon Press, 1968. P. 165).
- [5] *Huse N., Schonle A., Hell S.V.* // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6. N 4. P. 480–484.
- [6] *Ельяшевич М.А.* Атомная и молекулярная спектроскопия. М: Эдиториал УРСС, 2001. С. 759.
- [7] *Блохинцев Д.И.* Основы квантовой механики. М.: Наука. 1976. С. 372.
- [8] *Bashkansky M., Park D., Fatemi F.K.* // *Opt. Express.* 2010. V. 18. N 1. P. 212–217.
- [9] *Sick B., Hecht B., Novotny L.* // *Phys. Rev. Lett.* 2000. V. 85. N 21. P. 4482–4485.
- [10] *Toninellil C., Early K., Bremil J.* et al. // *Opt. Express.* 2010. V. 18. N 7. P. 6577–6582.