

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРОИЗВОЛЬНО ОРИЕНТИРОВАННЫХ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ ПОСРЕДСТВОМ КОНФОКАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

С.В. Бойченко, С.А. Зилов

ARBITRARY ORIENTED SINGLE MOLECULE IMAGING BY MEANS OF SCANNING CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPY

S.V. Boichenko, S.A. Zilov

Показано расчетным путем, что за счет применения эллиптически-поляризованного цилиндрического векторного луча в лазерной сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии можно практически исключить зависимость максимума интенсивности на изображении одиночной молекулы, моделируемой электрическим ротатором, от ее ориентации.

We show by calculative methods that one can nearly eliminate single-molecule image intensity maximum dependence on the orientation of electrical rotator simulated molecule by using elliptically-polarized cylindrical vector beam in laser-scanning confocal fluorescence microscopy.

Флуоресцентная спектроскопия одиночных молекул (под молекулой понимается как обычная флуоресцентная молекула, так и молекулородобная квантовая система, такая как центр окраски, квантовая точка и др.) возникла в начале 1980-х гг. и в данный момент представляет собой современное динамично развивающееся научное направление. Она предоставляет возможность изучать как непосредственно одиночные молекулы, внедренные в прозрачную твердотельную матрицу, так и свойства данной матрицы по наблюдаемым характеристикам молекул [Осадько, 2006; Наумов, 2013].

Большинство одиночных молекул испускают и поглощают свет как электродипольные осцилляторы. Из-за анизотропии диаграммы направленности излучения молекулы и зависимости вероятности ее возбуждения от взаимной ориентации вектора ее квантово-механического дипольного момента и светового вектора возбуждающего поля (в общем случае это комплексные векторы) возбуждение произвольно ориентированных молекул является проблемой в микроскопии одиночных молекул. Тем не менее в некоторых приложениях визуализация одиночных квантовых систем произвольной ориентации необходима, поэтому решение упомянутой проблемы приобретает особую актуальность.

С целью визуализации одиночных молекул разработаны различные люминесцентно-микроскопические методики, одной из которых является конфокальная сканирующая микроскопия. Таким образом, частной задачей визуализации одиночных молекул является задача визуализации произвольно ориентированных молекул посредством лазерной конфокальной сканирующей флуоресцентной (ЛКСФ) микроскопии. Она решается за счет применения возбуждающего луча с пространственно-неоднородной поляризацией [Sick et al., 2000; Бойченко, Мартынович, 2013]. Наиболее часто применяется ЛКСФ-микроскоп с эпифлуоресцентной схемой, приведенной на рис. 1. Сущность такой схемы заключается в том, что фокусировка возбуждающего излучения и светосбор люминесценции производятся одним и тем же объективом. Чаще всего молекулы испускают и поглощают свет как линейные электродипольные осцилляторы. Однако в некоторых случаях они поглощают и испус-

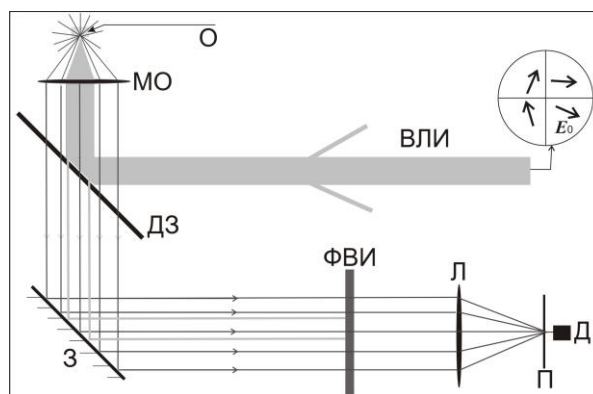


Рис. 1. Эпифлуоресцентная схема лазерного конфокального сканирующего флуоресцентного микроскопа. Обозначения: О – исследуемый образец, МО – микрообъектив, ВЛИ – возбуждающее лазерное излучение (поперечное сечение луча показано отдельно: E_0 – световой вектор), ДЗ – дихроичное зеркало, З – зеркало, ФВИ – фильтр возбуждающего (лазерного) излучения, Л – собирающая линза, П – пинхол, Д – детектор.

кают его как электрические ротаторы. Такая ситуация может иметь место, например, если молекула находится в постоянном магнитном поле. Настоящая работа посвящена анализу возможности максимально эффективного возбуждения молекулы, моделируемой электрическим ротатором, с помощью ЛКСФ-микроскопии.

Ранее нами было показано, что молекулы, моделируемые линейными дипольными осцилляторами, можно возбуждать одинаково эффективно независимо от ориентации их дипольных моментов перехода при использовании эллиптически-поляризованного цилиндрического векторного луча в качестве возбуждающего в схеме ЛКСФ-микроскопа [Бойченко, Мартынович, 2013]. В связи с этим представляется целесообразным провести аналогичное исследование применительно к молекулам, моделируемым электрическими ротаторами. В данной работе мы ищем расчетным путем возбуждающий луч, способный обеспечить возбуждение одиночного ротатора вне зависимости от ориентации его плоскости. Световое поле входного луча имеет вид

$$E_0(\theta, \varphi; A, \Phi) = E_r(\varphi) + A \exp(i\Phi) E_\varphi(\varphi), \quad (1)$$

где \mathbf{E}_ϕ и \mathbf{E}_r – векторы азимутальной и радиальной поляризации; θ и ϕ – полярный и азимутальный углы, задающие координаты точки в поперечном сечении луча; A и Φ – параметры эллиптичности. Расчет проводится по методу, описанному в [Бойченко, Мартынович, 2012]; параметры схемы: $\theta_{\max}=64^\circ$, $f=\infty$, длина волны возбуждающего излучения – 532 нм.

Под ориентацией ротатора мы будем понимать ориентацию оси симметрии ротатора – нормали к плоскости, в которой вращается ротатор. Интенсивность в точке конфокального сканированного флуоресцентного изображения определяется выражением

$$I(r, n) \propto (1 + \alpha \cos 2\theta) |\mathbf{E}(\mathbf{r})\mathbf{D}(\mathbf{n})|^2, \quad (2)$$

где \mathbf{r} – радиус-вектор точки фокального объема, \mathbf{n} – ось симметрии ротатора, \mathbf{E} – световое поле в фокальном объеме, \mathbf{D} – вращающийся дипольный момент, θ – полярный угол оси ротатора в заданной системе координат, α – коэффициент вариации светосбора (при $\theta_{\max}=64^\circ$, $\alpha=0.11$). Для описания эффективности возбуждения произвольно ориентированных ротаторов мы пользуемся отношением максимального значения интенсивности на ЛКСФ-изображении минимально возбуждаемого ротатора к аналогичному значению на изображении максимально возбуждаемого ротатора [Бойченко, Мартынович, 2012]:

$$\varepsilon = \frac{\max_{x,y}(I_{\min ex})}{\max_{x,y}(I_{\max ex})}. \quad (3)$$

Данный параметр определяет, насколько сильно зависит максимум интенсивности изображения ротатора от его ориентации.

Для предварительной оценки мы вычислили значения параметра эффективности для некоторых лучей с более простой поляризацией. Получились следующие результаты: линейно-поляризованный луч – $\varepsilon=12\%$, циркулярно-поляризованный луч – $\varepsilon=0.5\%$, радиально-поляризованный луч – $\varepsilon=30\%$, азимутально-поляризованный луч – $\varepsilon=80\%$. Можно отметить, что при возбуждении азимутально-поляризованным лучом получается высокое значение параметра эффективности. Однако это значение не является предельным, в связи с чем мы провели исследование зависимости параметра эффективности от параметров эллиптичности. Результаты исследования представлены на рис. 2. Своего максимального значения $\varepsilon=94\%$ исследуемая функция достигает при $A=0.26$, $\Phi=0$. Это значение лишь незначительно меньше предельно достижимого ($\varepsilon=100\%$), т. е. удастся достичь почти максимальной

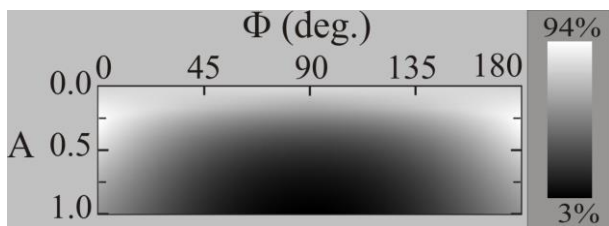


Рис. 2. Зависимость параметра эффективности от параметров эллиптичности.

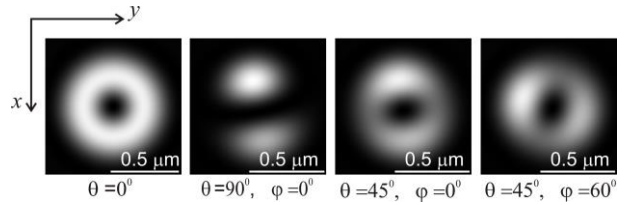


Рис. 3. ЛКСФ-изображения ротаторов различной ориентации.

эффективности визуализации произвольно ориентированных ротаторов.

На рис. 3 представлены ЛКСФ-изображения ротаторов некоторых ориентаций. Углы θ и ϕ задают ориентацию оси ротатора. Изображения нормированы на максимум максимально возбуждаемого ротатора. Можно видеть, что максимум интенсивности на изображении не зависит от ориентации. Тем временем распределение интенсивности на изображении зависит от ориентации, благодаря чему, в принципе, путем обработки изображений, регистрируемых в эксперименте, можно определять ориентацию ротаторов.

Таким образом, нами предложен метод максимально эффективной визуализации одиночных квантовых систем, моделируемых электрическими ротаторами, посредством ЛКСФ-микроскопии. Данный метод также предусматривает возможность определения ориентации ротаторов.

Работа выполнена по программам ОФН РАН (проект № III.9.3) и СО РАН – НАН Беларуси (проект № 13).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бойченко С.В., Мартынович Е.Ф. Модернизация люминесцентного сканирующего конфокального микроскопа для наблюдения единичных квантовых систем с произвольной ориентацией // Письма в ЖТФ. 2012. Т. 38, вып. 8. С. 72–80.
- Бойченко С.В., Мартынович Е.Ф. Комплексный цилиндрический векторный пучок исключает зависимость интенсивности сканированных флуоресцентных изображений одиночных молекул от ориентации // Письма в ЖЭТФ. 2013. Т. 97, вып. 1. С. 56–60.
- Наумов А.В. Спектроскопия органических молекул в твердых матрицах при низких температурах: от эффекта Шпольского к лазерной люминесцентной спектроскопии всех эффективно излучающих одиночных молекул // УФН. 2013. Т. 183, № 6. С. 633–652.
- Осадько И.С. Флуктуирующая флуоресценция одиночных молекул и полупроводниковых нанокристаллов // УФН. 2006. Т. 176, № 1. С. 23–57.
- Sick B., Hecht B., Novotny L. Orientational imaging of single molecules by annular illumination // Phys. Rev. Lett. 2000. V. 85, N 21. P. 4482–4485.

Иркутский филиал Института лазерной физики СО РАН, Иркутск, Россия