

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРОИЗВОЛЬНО ОРИЕНТИРОВАННЫХ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ ВБЛИЗИ МЕТАЛЛИЧЕСКОЙ ПОВЕРХНОСТИ

С.В. Бойченко

HIGH-EFFICIENT VISUALIZATION OF ARBITRARILY ORIENTED SINGLE MOLECULES NEAR THE METAL SURFACE

S.V. Boichenko

Посредством математического моделирования исследована флуоресцентная визуализация произвольно ориентированных одиночных молекул родамина 6G, находящихся в пленке полиметилметакрилата под плоским слоем серебра. Показано, что при определенных расстояниях между металлической поверхностью и плоскостью, содержащей одиночные молекулы, возможно исключить зависимость яркости изображений молекул от ориентации их дипольных моментов перехода. Однако, при некоторых расстояниях визуализация молекул определенной ориентации невозможна.

We theoretically simulate the fluorescence visualization of arbitrarily oriented Rhodamine 6G single molecules situated in a poly(methyl methacrylate) film under a plane silver layer. It is demonstrated that for some distances between the silver surface and the plain containing single molecules one can eliminate the dependence of the molecule image brightness on the orientation of the molecular transition dipole moment. However, for some distances, it is impossible to visualize molecules of some orientations.

Введение

Флуоресцентная микроскопия одиночных молекул (ОМ) широко применяется на сегодняшний день и представляет собой мощный исследовательский инструмент в таких приложениях, как нанофотоника, биомедицина, химия высокомолекулярных соединений и ряде других [Walter, 2008]. В большинстве случаев, одиночные молекулы испускают и поглощают свет как дипольные осцилляторы. Так как вероятность возбудить одиночную молекулу с дипольным моментом перехода \mathbf{d} световым полем \mathbf{E} пропорциональна скалярному произведению $\mathbf{E}\mathbf{d}$, обычные методы микроскопии ОМ (где в большинстве случаев применяется линейно-поляризованное возбуждающее световое поле) не позволяют наблюдать одиночные молекулы любых ориентаций. Однако для некоторых приложений необходимо наблюдать все ОМ независимо от их ориентаций. Таким образом, возникает проблема визуализации произвольно ориентированных одиночных молекул (ПООМ) в микроскопии ОМ.

Поскольку оптическое взаимодействие ОМ с пространственными неоднородностями представляет как фундаментальный, так и прикладной интерес, становится актуальной задача визуализации ПООМ вблизи пространственных неоднородностей, в частности вблизи металлической поверхности [Stefani et al., 2005]. В данной работе мы исследуем в качестве примера визуализацию одиночной молекулы родамина 6G вблизи плоского слоя серебра расчетно-теоретическим путем.

Проблема визуализации ПООМ и метод ее решения

Проблему визуализации ПООМ можно представить следующим образом. Исследуемый образец (например, полимерная пленка) содержит ОМ в сверхмалой концентрации (менее 1 молекулы/мк²). Дипольные моменты перехода молекул не выстроены, т. е. ориентированы произвольно, а сами молекулы лежат в одной плоскости. Требуется построить флуоресцентное изображение участка образца так, чтобы на нем были видны изображения всех оди-

ночных молекул, находящихся на участке, независимо от их ориентаций.

Одним из наиболее эффективных методов флуоресцентной микроскопии для решения проблемы визуализации ПООМ является лазерная конфокальная сканирующая флуоресцентная микроскопия (ЛКСФМ). В данном случае, проблема решается за счет формирования пространственно-неоднородной поляризации светового поля в фокальном объеме, получаемой посредством острой фокусировки возбуждающего лазерного луча. Такой метод был впервые предложен в работе [Sick et al., 2000] и до сегодняшнего дня существенно усовершенствован. В частности, нами ранее было показано, что достижения практически предельно эффективная визуализация ПООМ, находящихся в свободном пространстве [Бойченко, Мартынович, 2013] и в специальном микрорезонаторе [Boichenko, Koenig, 2015]. Этот результат был достигнут за счет применения оптимального эллиптически-поляризованного цилиндрического векторного пучка (ЭПЦВП) в качестве возбуждающего луча в схеме ЛКСФМ микроскопа. Световое поле ЭПЦВП задается следующим образом:

$$\mathbf{E}_0 = \mathbf{E}_r + A \exp(i\Phi) \mathbf{E}_\varphi, \quad (1)$$

где \mathbf{E}_φ и \mathbf{E}_r – векторы азимутальной и радиальной поляризации; A и Φ – параметры эллиптичности.

Для количественного описания эффективности визуализации произвольно ориентированных молекул мы применяем подход сравнения «наименее яркой» и «наиболее яркой» ориентации [Бойченко, Мартынович, 2013; Boichenko, Koenig, 2015]. Используется параметр эффективности

$$\varepsilon = \frac{\max(I_{\text{dim}})}{\max(I_{\text{bright}})}, \quad (2)$$

где $\max(I_{\text{dim}})$ и $\max(I_{\text{bright}})$ – максимальные значения яркости на ЛКСФМ изображениях «наименее яркой» и «наиболее яркой» молекулы, соответственно. Данный параметр может принимать значения от 0 до 1. Качество визуализации тем выше, чем больше численное значение параметра эффективности.

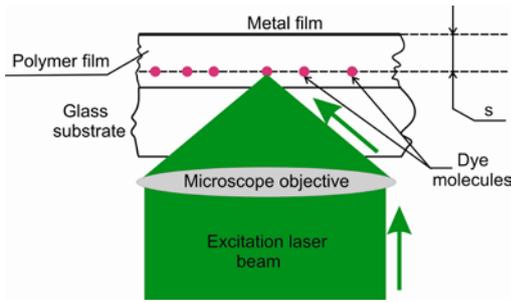


Рис. 1. Схема наблюдения одиночных молекул методом лазерной сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Параметры модели

В данной работе мы моделируем процесс построения ЛКСФМ изображений ОМ, внедренных в полимерную матрицу и находящихся вблизи металлической поверхности. Схема предполагаемого экспериментального образца приведена на рис. 1. В качестве молекул флуоресцентного красителя мы рассматриваем молекулы родамина 6G (возбуждение – 532 нм, максимум флуоресценции – 560 нм, квантовый выход равен 1); в качестве металла – серебро

$$n(532 \text{ nm})=0.143+i*3.052,$$

$$n(560 \text{ nm})=0.146+i*3.266,$$

где n – показатель преломления [Rakić et al., 1998]; в качестве полимера – полиметилметакрилат ($n=1.5$); показатель преломления стекла предполагается равным 1.5. В качестве возбуждающего лазерного луча мы берем ЭПЦВП (1). При этом параметр эффективности визуализации ПООМ (2) становится функцией параметров эллиптичности A и Φ , и мы оптимизируем его по данным параметрам. Расчет светового поля в фокальном объеме проводится по методу Ричардса–Вольфа [Richards, Wolf, 1959; Novotny, Hecht, 2012], а расчет диаграмм направленности и времени затухания флуоресценции ОМ – по методу разложения светового поля дипольного осциллятора в угловой спектр [Novotny, Hecht, 2012]. Микро-объектив предполагается масляно-иммерсионным ($n=1.5$) с угловой апертурой 64° .

Флуоресценция ОМ вблизи металлического слоя

Перед моделированием визуализации ОМ нами были проанализированы квантовый выход молекул и время затухания их флуоресценции в зависимости от расстояния s (см. рис. 1). Данный анализ необходим, так как наличие пространственных неоднородностей (в данном случае, слоя серебра) влияет на флуоресцентные свойства ОМ и существенно изменяет их. На рис. 2 приведены графики зависимости квантового выхода ОМ, ориентированных перпендикулярно металлическому слою (Q_z) и параллельно ему (Q_{pl}), в зависимости от расстояния s . Предполагается, что толщина металлического слоя составляет свыше 30 нм. Из графиков видно, что при расстоянии s порядка 80 нм z -ориентированная молекула практически не испускает флуоресценцию (ось z совпадает с осью объектива). Это означает, что при таких расстояниях ее визуализация практически невозможна.

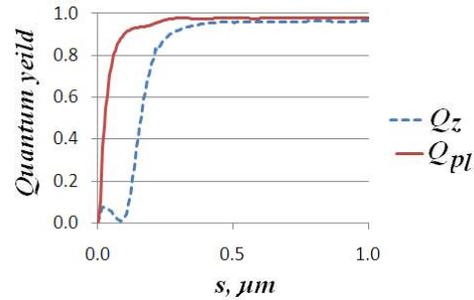


Рис. 2. Квантовый выход флуоресценции одиночных молекул в зависимости от расстояния между молекулой и металлическим слоем. Q_z – квантовый выход z -ориентированных молекул, Q_{pl} – квантовый выход молекул, параллельных металлическому слою.

Результаты моделирования визуализации ПООМ вблизи металлического слоя

Был рассчитан ϵ -параметр (2) как функция оптимального ЭПЦВП (1) для ряда расстояний s при слое серебра толщиной свыше 30 нм и при слое толщиной 10 нм. Рассматривались два варианта возбуждения ОМ: (1) непрерывным лазерным излучением (обозначение параметра эффективности – ϵ_{cw}); (2) импульсным излучением, удовлетворяющим условию $\tau_p \ll \tau_f \ll 1/\nu$, где τ_p – длительность импульса, τ_f – время затухания флуоресценции, ν – частота следования импульсов (обозначение параметра эффективности – ϵ_p). Получились следующие результаты. Слой серебра толщиной свыше 30 нм:

$$\begin{aligned} s=10 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=93 \%, \epsilon_p=55 \%; \\ s=30-100 \text{ нм} &- \epsilon_{cw} \sim 0, \epsilon_p \sim 0; \\ s=150 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=94 \%, \epsilon_p=95 \%; \\ s=300 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=69 \%, \epsilon_p=72 \%; \\ s=400 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=94 \%, \epsilon_p=94 \%; \\ s=500 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=92 \%, \epsilon_p=93 \%. \end{aligned}$$

Слой серебра толщиной 10 нм:

$$\begin{aligned} s=10 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=39 \%, \epsilon_p=38 \%; \\ s=50 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=63 \%, \epsilon_p=43 \%; \\ s=100 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=96 \%, \epsilon_p=94 \%; \\ s=300 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=55 \%, \epsilon_p=58 \%; \\ s=400 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=95 \%, \epsilon_p=97 \%; \\ s=500 \text{ нм} &- \epsilon_{cw}=95 \%, \epsilon_p=95 \%. \end{aligned}$$

Невозможность визуализации ОМ вблизи толстого слоя серебра для некоторых значений расстояния s ($\epsilon \sim 0$) объясняется исчезновением флуоресценции z -ориентированной молекулы в данном диапазоне расстояний. Но, как видно из приведенных данных, при определенных значениях s вполне возможна высокоэффективная визуализация ПООМ ($\epsilon > 90 \%$). Это означает, что эффективное изучение ПООМ в данных условиях выполнимо при наличии возможности изменения расстояния между металлическим слоем и плоскостью, содержащей ОМ [Chu et al., 2014].

Заключение

Эффективность визуализации ПООМ, находящихся вблизи металлической поверхности, методом ЛКСФМ с использованием эллиптически-поляризованных цилиндрических векторных пучков существенно зависит от расстояния между плоскостью,

содержащей ОМ, и слоем металла. При определенных значениях этого расстояния возможна предельно эффективная визуализация ПООМ. Однако при некоторых расстояниях визуализация невозможна.

Работа выполнена по программе ОФН РАН III.9 и программе СО РАН II.10.1 (проект № II.10.1.6.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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.

Boichenko S., König K. Extremely high efficiency in arbitrarily oriented single molecule fluorescence imaging // J. Opt. Soc. Am. B 2015. V. 32. P. 601–605.

Chu X.-L., Brenner T.J.K., Chen X.-W., et al. Experimental realization of an optical antenna designed for collecting 99 % of photons from a quantum emitter // Optica 2014 V. 1. P. 203–208.

Novotny L., Hecht B. Principles of Nano-Optics, 2nd edition, Cambridge University Press, 2012. 584 p.

Rakić A.D., Djurišić A.B., Elazar J.M., Majewski M.L. Optical properties of metallic films for vertical-cavity optoelectronic devices // Appl. Opt. 1988. V. 37. P. 5271–5283. (The data were taken from the Refractive Index Database, <http://refractiveindex.info>.)

Richards B., Wolf E. Electromagnetic diffraction in optical systems // Proc. R. Soc. London A 1959. V. 253. P. 358–379.

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.

Stefani F.D., Vasilev K., Bocchio N., et al. Surface-Plasmon-Mediated Single-Molecule Fluorescence Through a Thin Metallic Film // Phys. Rev. Lett. 2005. V. 94, N 023005.

Walter N.G., Huang C.-Y., Manzo A.J., Sobhy M.A. Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit // Nat. Methods. 2008. V. 5. P. 475–489.

Иркутский филиал Института лазерной физики СО РАН, Иркутск, Россия