



В 2004 году физики Эрик Бетциг, Уильям Мёрнер и Штефан Хель были удостоены Нобелевской премии за «создание флуоресцентной микроскопии высокого разрешения». Разработанные ими методики позволили на порядок улучшить разрешающую способность современных оптических микроскопов, хотя долгое время считалось, что оптическая микроскопия достигла своего фундаментального предела разрешения (предела Аббе). Данная задача состоит из 3 частей. В Части А вам предлагается вывести выражение предела разрешающей способности по Аббе. В Части В вам нужно будет познакомиться с явлением флуоресценции и показать, как с ее помощью преодолеть предел Аббе. В Части С вы сможете описать метод улучшения разрешения за счет интерференции.

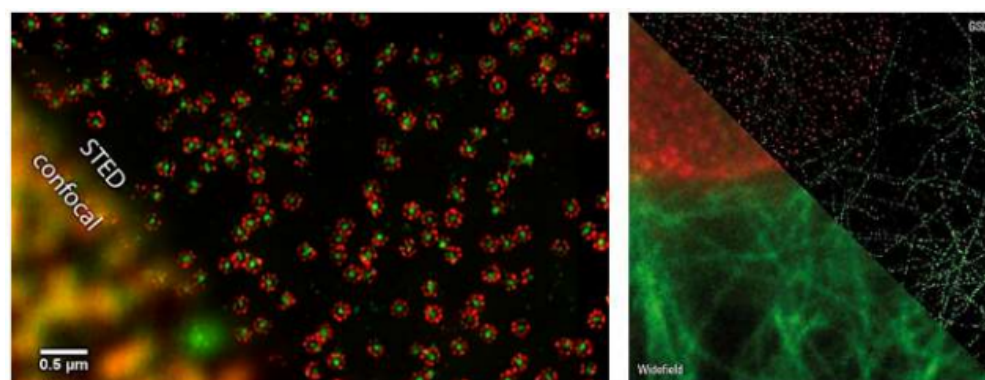


Рис. 1. Микрофотографии белков в клетке, полученные с помощью традиционных методов (левые углы обеих картинок, confocal, widefield) и с помощью флуоресцентной наноскопии (правые углы обеих картинок, STED, GSD).

Часть А. Предел Аббе

Объектив микроскопа формирует увеличенное действительное изображение образца. Разрешение микроскопа определяется в первую очередь свойствами объектива. При выводе выражения предела Аббе и далее рассмотрите оптическую систему, состоящую из одной тонкой линзы (объектива).

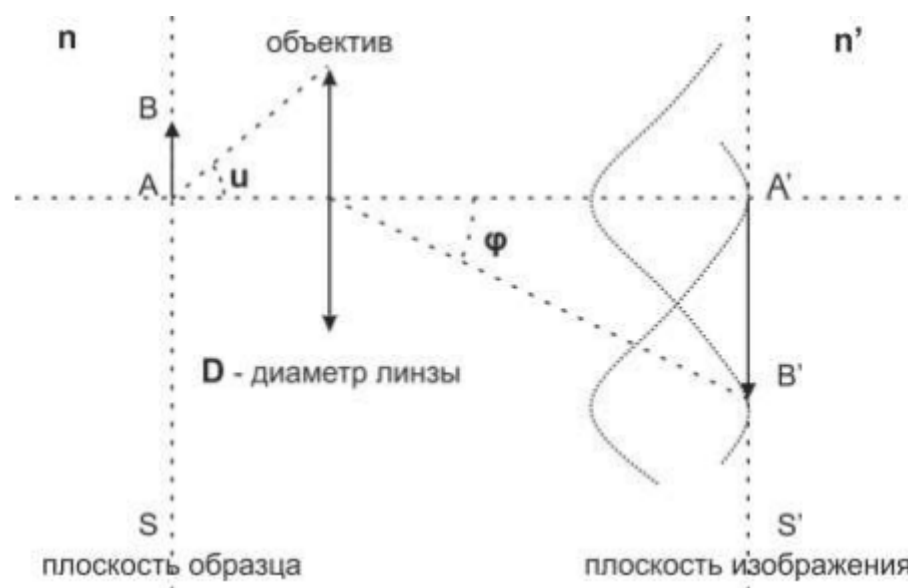


Рис. 2. Схема для выражения предела Аббе. Точность изображения $A'B'$ образца AB , полученного с помощью объектива ограничено из-за дифракции на линзе D .

Как показано на рис. 2., тонкая линза диаметром D помещена между двумя средами с разными коэффициентами преломления: n – слева, со стороны образца, и n' – справа, со стороны изображения. Предел разрешения – расстояние $\Delta_0 = AB$ между двумя такими точечными источниками A и B , что максимум интенсивности изображения B (точка B') совпадает с минимумом интенсивности изображения A (точка A'). В вакууме направление на минимум интенсивности изображения A' источника A определяется из уравнений дифракции Фраунгофера на линзе $D \sin \varphi = 1.22\lambda$. При вычислениях не забудьте учесть поправки, связанные с присутствием вещества слева и справа от линзы.

A1^{0.70} Выразите предел разрешения $\Delta_0 = AB$ через λ (длина волны света в вакууме), D , n , n' и $\sin u$ (угол u отмечен на рис. 2). При выводе пользуйтесь параксиальным приближением.

A2^{0.30} Изначально система находится в вакууме $n = n' = 1$. Экспериментатор может наполнить пространство слева или справа от линзы (рис. 2) маслом. Куда нужно добавить масло, чтобы улучшить разрешение?
а) со стороны образца; б) со стороны изображения

Часть В. Понятие флуоресценции

Флуоресцентные молекулы и вещества способны поглощать фотоны определенной длины волны λ_1 , а затем в течение короткого времени излучать фотоны с большей длиной волны $\lambda_2 > \lambda_1$ (см. рис. 3). Вероятность поглощения молекулой фотона в единицу времени пропорциональна интенсивности падающего на нее излучения I_1 и равна $\sigma_1 I_1$. Энергия в этом процессе уходит во внешнюю среду

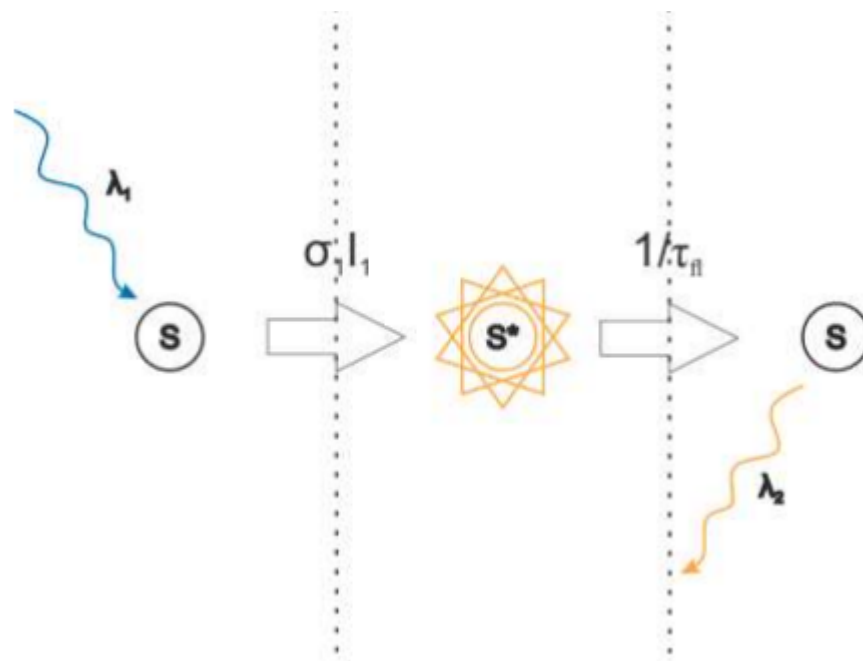


Рис. 3. Флуоресцентная молекула в состоянии S может поглотить фотон λ_1 , перейти в состояние S^* , а затем испустить фотон λ_2 .

Флуоресценция подчиняется законам квантовой механики и может быть упрощенно описана следующей схемой квантовых состояний (рис. 4).

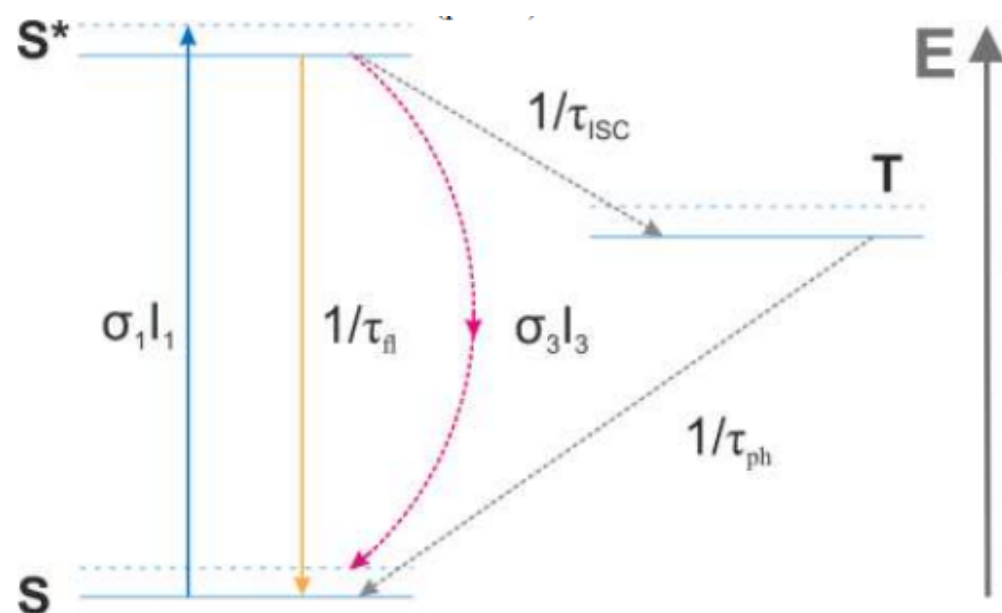


Рис. 4. Флуоресцентная молекула имеет три состояния S , S^* и T и переходит между ними, поглощая или испуская фотоны.

Для начала будем считать, что флуоресцентная молекула имеет 2 состояния: основное S и возбужденное S^* (переходы в третье T состояние очень редки). При поглощении фотона λ_1 молекула переходит из S в S^* . С вероятностью $1/\tau_{fl}$ в единицу времени молекула в состоянии S^* испускает фотон λ_2 и возвращается в S .

B1^{0.50} Пусть на ансамбль из $N_0 \gg 1$, первоначально находящихся в состоянии S , начинает падать излучение с интенсивностью I_1 и длиной волны λ_1 . Сколько в среднем молекул N^* будет находиться в состоянии S^* , когда система достигнет динамического равновесия?

B2^{0.50} Постройте график зависимости $N^*(I_1)$, получившейся в пункте B1, и получите приближение при малых I_1 .

В дальнейшем используйте приближение, получившееся в пункте B2.

Рассмотрим теперь устройство флуоресцентного микроскопа (рис. 5). Излучение длиной волны λ_1 фокусируется объективом в плоскости образца. Образец, поглотив фотоны λ_1 , излучает фотоны λ_2 . Испущенные фотоны λ_2 проходят обратно через объектив и формируют изображение. Специальное зеркало, отражающее λ_1 , но прозрачное для λ_2 используют, чтобы разделить два вида фотонов по длине волны.

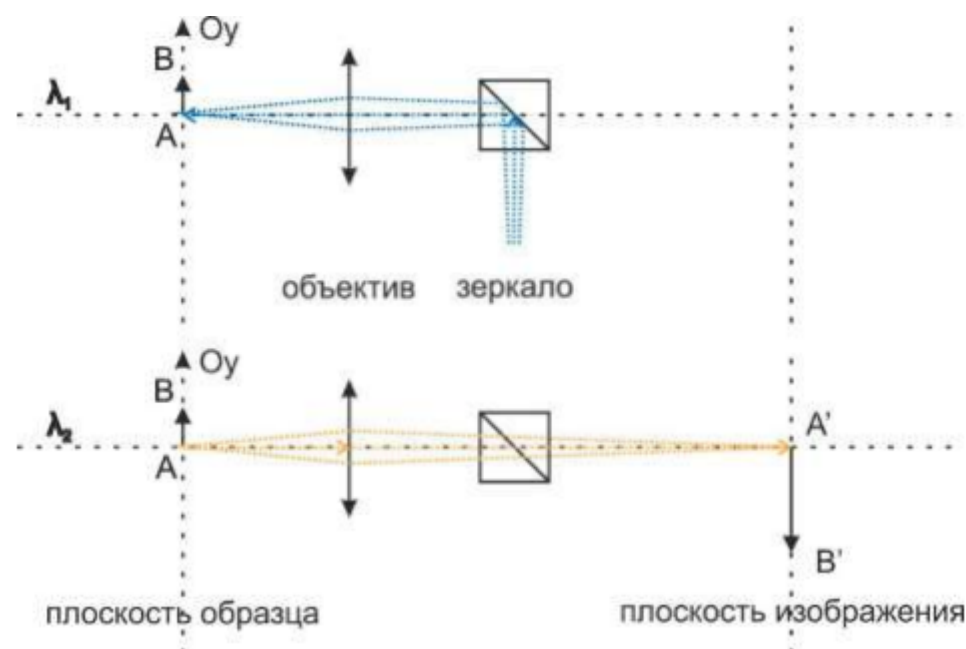


Рис. 5. Схема флуоресцентного микроскопа. Излучение λ_1 отражается от зеркала и фокусируется на образце объективом. Испущенное излучение λ_2 проходит через объектив и зеркало и формирует изображение.

Разрешение в флуоресцентной микроскопии определяется распределением интенсивности излучения λ_1 , падающего на образец. Из-за дифракции его интенсивность в плоскости образца распределена по закону

$$I_1(y) = I_1(0) \exp\left(-\frac{y^2}{\Delta_0^2}\right), \quad (1)$$

где Δ_0 – это предел разрешения Аббе, полученный в части А.

STED (STimulated Emission Depletion)

Рассмотрим явление стимулированного излучения (STED): если на молекулу в состоянии S^* падает фотон $\lambda_3 > \lambda_2, \lambda_1$, молекула может вернуться в состояние S , испустив фотон $\lambda'_3 = \lambda_3$. Вероятность такого перехода в единицу времени равна $\sigma_3 I_3$ (рис. 4). Фотоны λ'_3 , испущенные при стимулированном излучении (STED) не участвуют в формировании изображения. На тех участках образца, где такие переходы происходят, уменьшается число молекул в состоянии S^* , а значит и число испущенных фотонов λ_2 . Если максимум интенсивности излучения λ_1 на образце, совпадает с минимумом интенсивности излучения λ_3 на образце, то это сузит на нём область, где молекулы могут излучить фотоны λ_2 . Размер этой области изначально был ограничен пределом разрешения Δ_0 (см. формулу (1)), так что такое улучшение будет, фактически, преодолением предела Аббе. На практике это можно сделать следующим образом. Пучок излучения λ_3 пропускают через диафрагму диаметром d . В центре этой диафрагмы устанавливают фазовую пластинку некоторого радиуса. Эта пластинка добавляет фазу π прошедшим через нее лучам.

B3^{0.50} При каком радиусе пластинки r_0 минимум интенсивности λ_3 на образце равен нулю?

На практике часто применяются фазовые пластинки с более сложным профилем, которые дают распределение интенсивности λ_3 на образце

$$I_3(y) = I_{3,\max} \cdot \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos \frac{\pi y}{\Delta_0} \right)$$

Такое распределение также имеет характерную ширину Δ_0 . Поскольку мы будем говорить о преодолении предела Аббе, то уместно приближение $y \ll \Delta_0$.

B4^{0.50} Преобразуйте формулу выше, используя приближение $y \ll \Delta_0$.

Существует два метода использования метода STED: cwSTED (continious wave STED, STED с постоянным облучением) и ptgSTED (pulsed time gated STED, STED с импульсными возбуждением и съемкой).

STED с постоянным облучением (cwSTED)

B5^{1.00} Пусть образец облучается одновременно двумя лазерами I_1 (распределение интенсивности (1)), и I_3 (распределение интенсивности из пункта B4). Доля N^*/N_0 молекул, находящихся в состоянии S^* , может быть записана как

$$\frac{N^*}{N_0} = A \exp \left(- \frac{y^2}{\Delta_{\text{cwSTED}}^2} \right)$$

На практике мощность $I_{3,\max}$ велика, и $\sigma_3 I_{3,\max} \gg \sigma_1 I_1(0)$. Найдите параметры A и Δ_{cwSTED} .

Примечание: Используйте приближение $\frac{1}{1+x} \approx 1 - x \approx e^{-x}, x \ll 1$.

Обратите внимание, что величина Δ_{cwSTED} – предел разрешения, который определен так же, как раньше определялся предел разрешения Аббе Δ_0 .

B6^{0.50} Нарисуйте на одном графике качественные зависимости $I_1(y)$, $I_3(y)$ и $N^*(y)/N_0$.

B7^{0.50} Определите, при каком $I_{3,\max}$ достигается десятикратный выигрыш в разрешении, т.е. $\Delta_{\text{cwSTED}} = \Delta_0/10$.

STED с импульсными возбуждением и съемкой (pgtSTED)

B8^{1.00} Пусть теперь образец облучается в течение времени $\tau_1 \ll \tau_{fl}$ лазером I_1 (распределение интенсивности (1)), а после этого в течение времени τ_3 лазером I_3 (распределение интенсивности из пункта B4). Доля N^*/N_0 молекул, находящихся в состоянии S^* , может быть записана как

$$\frac{N^*}{N_0} = A \exp \left(- \frac{y^2}{\Delta_{\text{pgtSTED}}^2} \right)$$

На практике мощность $I_{3,\max}$ велика, и $\sigma_3 I_{3,\max} \gg \sigma_1 I_1(0)$. Найдите параметры A и Δ_{pgtSTED} .

Истощение основного состояния (GSD, ground state depletion)

Кроме состояний S и S^* флуоресцентная молекула имеет также третье состояние T . Переход $S^* \rightarrow T$ имеет характерное время τ_{ISC} , переход $T \rightarrow S$ имеет характерное время τ_{ph} , причем $\tau_{ph} \gg \tau_{ISC} \gg \tau_{fl}, 1/(\sigma_1 I_1)$. (Считайте, что из состояния T молекула не возвращается в состояние S за время эксперимента.) Пусть на образец в течение времени τ'_1 падает излучение лазера λ_1 с распределением

$$I'_1 = I'_{1,\max} \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos \frac{\pi y}{\Delta_0} \right).$$

Затем в течение некоторого времени τ_1 производится возбуждение флуоресценции тем же лазером λ_1 , но с распределением интенсивности (1). Причем, $\tau_{fl} \ll \tau_1 \ll \tau_{ph}$. Здесь, как и ранее, справедливы приближения пунктов B2 и B4.

B9^{2.00} Доля N^*/N_0 молекул, находящихся в состоянии S^* , может быть записана как

$$\frac{N^*}{N_0} = A \exp \left(- \frac{y^2}{\Delta_{\text{GSD}}^2} \right).$$

Найдите параметры A и Δ_{GSD} .

Часть С. Интерференционная 4π-микроскопия и улучшение аксиального разрешения

В части В были рассмотрены методы, позволяющие улучшить разрешение флуоресцентного микроскопа в плоскости образца. Проблема разрешения вдоль оптической оси стоит более остро – оно изначально хуже. Для решения этой проблемы применяется интерференционная микроскопия.

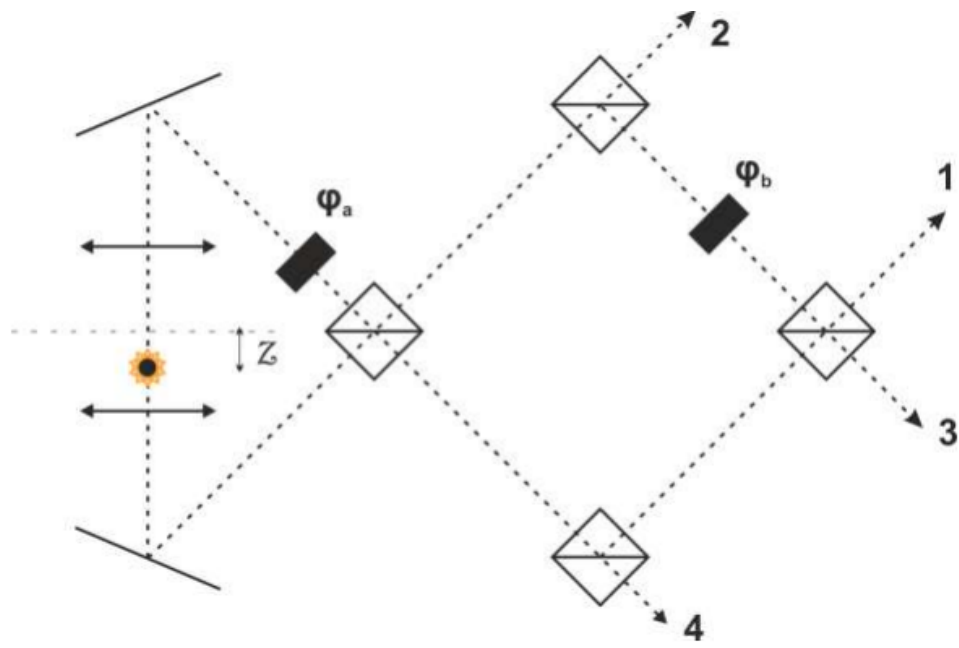


Рис. 6. Интерференционная схема, позволяющая увеличить разрешение микроскопа вдоль оптической оси. Сигналы, полученные двумя объективами, комбинируются с помощью отражательных элементов 50:50 и фазовых пластинок.

В такой установке два изображения получается двумя объективами, настроенными на одну и ту же плоскость образца. Сигналы, получаемые с помощью объективов, делятся на призмах 50 : 50, причем отраженный луч набирает дополнительную фазу $\pi/2$. В оптическом пути также присутствуют две фазовые пластинки $\varphi_a = 3\pi/2$, $\varphi_b = 3\pi/2$. С помощью этих оптических элементов излучаемый образцом сигнал делится на несколько пучков с различными фазами и интерферирует, собираясь на детекторах 1, 2, 3 и 4. Будем считать, что в поле зрения есть единственный точечный источник, смещенный от плоскости, на которую настроены объективы, на $z < \lambda$.

C1^{2.00} Пусть интенсивности сигналов, собранных каждым из объективов, равны I_0 . Найдите интенсивности пучков, получаемых в результате интерференции на детекторах 1, 2, 3 и 4.

C2^{0.50} Нарисуйте графики найденных в C1 зависимостей.

C3^{0.50} Выразите z через отношения I_1/I_3 и I_2/I_4 , укажите, при каком сдвиге $z \rightarrow z + \Delta z$ эти отношения остаются неизменными?

Т

Оптика

Волновая оптика

2019

Сборы XY

Y

Современная физика

 Website in English

2020 — Мы те, кого должны превзойти.