透射式扫描近场光学显微镜探针光场分布 及其受激荧光分子光场分布研究*

王子洋 李 勤 赵 钧 郭继华[†]

(清华大学物理系, 单原子分子测控重点实验室, 北京 100084) (2000年1月17日收到2000年4月11日收到修改稿)

通过利用经 Grober 发展的 Bethe 模型,计算了透射式近场光学显微镜探针针尖附近及进入样品后的光场分布,研究了它的横向分辨率、透射深度、透射系数等问题.模拟在光学近场激发下生物荧光分子成像的过程,研究了 荧光分子的极化方向和入射光偏振方向对信号收集的影响,发现荧光图像是偏振极性和荧光分子极性共同作用的 结果.

关键词:近场光学,光场分布,荧光分子成像 PACC:4230,3115,0760P

1 引 言

近年来,扫描近场光学显微镜(SNOM)受到国 内外广泛重视^{1-7]},发展出各种不同结构的 SNOM,广泛应用于材料科学^[3]、生物学^{4,5]}和高密 度信息存储^{6]}等领域.特别是在生物学方面 SNOM 以其兼备扫描探针显微镜和光学显微镜的特点而具 有独特的优势,为了解细胞膜表面的特点以及分离 的各种细胞器的性质提供了有效工具.但是由于样 品的光学图像同时受其形貌和折射率的影响,并且 细胞结构较软,折射率差别小,这使得对所获图像的 解释增加了困难.相比之下,利用荧光标记可以较精 确地确定荧光分子的位置,与形貌图像相对应,使近 场荧光图像的解释可能更容易些.通过一些细胞内 的信息使者(如 Ca⁺),就可能研究细胞内及细胞间 信息的传递.

本文通过利用经 Grober^[8]发展的 Bethe 模型^[9],研究透射式 SNOM 探针针尖光场的特点,对 其横向分辨率、透射深度和透射系数等进行了讨论 分析,并在此基础上研究了近场中生物样品内荧光 分子极化指向对荧光成像的影响,这对正确理解荧 光成像有重要意义,对荧光图像的解释和处理提供 了理论依据.

2 光场的计算

透射式扫描近场光学显微镜的结构原理如图 1 所示.其具体结构和控制原理不在这里介绍,仅介绍 一些与理论计算相关的问题.光通过光纤探针照射 在生物样品上,样品的折射率为 n,内含荧光分子, 在光照下发出荧光并被显微物镜收集,经光电倍增 管转化成电信号.由于光纤探针照亮的区域很小,约 为 50 nm,远小于远场显微镜的瑞利衍射极限,所以 可以对荧光分子所处的位置更准确限定.若能快速 成像还可以看到荧光分子位置随时间的变化,用不 同偏振光激发有助于确定荧光分子的极化方向.



图 1 SNOM 示意图

^{*}国家自然科学基金重大项目(批准号:19890380-7)和国家自然科学基金青年基金项目(批准号:69808003)资助的课题。

[†]通讯联系人. E-mail copton@mail. tsinghua. edu. cn

为了进行理论计算,必须将实际问题进行适当 简化.光纤照明简化为直径为 d(d < λ)的小孔衍射 问题,由小孔衍射理论决定出射场的光场分布.当光 透过空气和生物样品界面照到样品内的生物荧光分 子上时,光在界面上要发生反射和透射,为简单起 见,计算中引入透射系数,但不计算多次反射.荧光 分子的激发由分子所处的光场决定,荧光分子被激 发后发射荧光可由电动力学的电偶极子发射求得. 这样一个模型虽然简单,但能反应近场成像本质的 基本特点.

2.1 理论模型

光场的计算采用小孔衍射的 Bethe 模型^[9],这 个模型是一个矢量模型,后来经 Bouwkamp 给以修 正^[10],可以给出在小孔平面光场的分布,这样就可 以利用衍射的角谱理论计算衍射区的光场分布. Grober 等人又对其模型作了修正^[8].他们在柱坐标 系内将小孔平面的场按本征函数展开,求得谱系数, 并对谱系数作了合理修正,用角谱理论的方法计算 其他各处的场分布.具体计算如下:

$$E(\rho ,\beta ,z ,f) = \int_{0}^{\infty} f_{TM}(k_{\rho}) E_{TM}(k_{\rho} ,\rho ,\beta ,z ,t) dk_{\rho} + \int_{0}^{\infty} f_{TE}(k_{\rho}) E_{TE}(k_{\rho} ,\rho ,\beta ,z ,t) dk_{\rho},$$

其中 E_{TM} 和 E_{TE} 是柱坐标系归一化本征函数,下标 TM 和 TE 表示 TM 波和 TE 波. f_{TM} 和 f_{TE} 是谱系 数. k_{ρ} 是波矢横向分量. 这些函数的具体形式在文 献 8 中已给出,并作了详细讨论,这里不再赘述.

与文献 8 不同之处是本文不仅要计算空气中 的光场,而且还必须计算生物样品内的光场,所以在 计算中应加进本征函数的透射系数,对应(1)式的计 算公式为

$$E(\rho ,\beta ,z ,t) = \int_{0}^{\infty} f_{\mathrm{TM}}(k_{\rho}) t_{\mathrm{TM}} E_{\mathrm{TM}}(k_{\rho} ,\rho ,\beta ,z ,t) dk_{\rho} + \int_{0}^{\infty} f_{\mathrm{TE}}(k_{\rho}) t_{\mathrm{TE}} E_{\mathrm{TE}}(k_{\rho} ,\rho ,\beta ,z ,t) dk_{\rho},$$

$$(2)$$

其中

$$e_{\rm TM} = \frac{2k_{1z}}{\frac{n_2}{k_{1z}} + \frac{n_1}{k_{2z}}},$$
 (3)

$$t_{\rm TE} = \frac{2k_{1z}}{k_{1z} + k_{2z}} , \qquad (4)$$

$$k_{1z} = \begin{cases} \sqrt{n_1^2 k_0^2 - k_\rho^2} & n_1 k_0 \geqslant k_\rho , \\ i \sqrt{k_\rho^2 - n_1^2 k_0^2} & k_\rho \geqslant n_1 k_0 , \end{cases}$$
(5)
$$k_{2z} = \begin{cases} \sqrt{n_2^2 k_0^2 - k_\rho^2} & n_2 k_0 \geqslant k_\rho , \\ i \sqrt{k_\rho^2 - n_2^2 k_\rho^2} & k_\rho \geqslant n_2 k_0 . \end{cases}$$
(6)

2.2 计算结果

2.2.1 横向分辨率

在下面的计算中我们假设入射光都以 X 偏振 入射 小孔的半径为 $\lambda/10$. 利用(2)式 ,首先计算了 当没有样品时($t_{TM} = t_{TE} = 1$)在距离针尖 $\lambda/100$ (即 $z_0 = \lambda/100$),垂直于入射波矢的平面上的光场强度 分布 结果如图 2 所示. 从图 2 可以看出在近场光照 亮的区域同小孔直径相当 ,而照亮区的大小直接决 定显微镜的分辨率 ,因此小孔的直径决定了显微镜 的分辨率. 另外值得注意的是光场在沿 X 和 Y 方向 的分布是不同的 ,这与由标量模型得到的旋转对称 场不同 ,这是由于 Bethe 模型是矢量场衍射模型.



图 2 小孔半径为 $\lambda/10$ 时,在距离小孔 $Z = \lambda/100$ 的光强 (E^2)分布

2.2.2 透射深度和透射系数

比较有样品和无样品时光强沿纵向(Z轴方向) 变化的情况.在 $Z_0 = \lambda/200$ 处加入折射率为 1.35 的样品,计算结果如图 3 所示.图 3 中 A 曲线是有



图 3 在空气和样品中光强沿 Z 轴变化的比较. A 为样品中, B 为空气中

样品时光强在样品中沿Z轴的变化 ,B 曲线是无样 品时(即在空气中)光强沿 Z轴的变化.由 A 可得 到入射光在样品中的透射深度 ,实际意义上的透射 深度应和入射光强度、荧光分子敏感度等有关 ,这里 为了体现入射光波在介质中的衰减情况 ,以光强衰 减为原来 e^{-1} 的距离表示其透射深度.由图 3 中 A曲线可知进入介质的光强为 0.38 ,当衰减为它的 e^{-1} 时 $\Delta Z \approx 0.06\lambda$,因此我们认为透射深度约为 0.06 λ .比较 A 曲线和B 曲线发现进入样品后光强 比无样品时还要大.对于这一现象我们的解释是 :--方面 ,当有样品时部分空气中的隐失波传到样品内 后变成传导波 ;另一方面 ,那些没有变成传导波的隐 失波 ,在样品中的衰减率变化.

3 荧光分子在光场激发和发射

3.1 荧光激发和发射理论模型

为进行荧光成像的模拟,首先用电偶极吸收和 发射理论来处理荧光分子的吸收和发射.在偶极近 似的条件下荧光强度可以表示为以下形式:

 $I \propto | E \cdot P_{ab} |^2 \rho_{rad}$, (7) 其中 I 是采集到的荧光强度 ,E 是针尖出射场强度 在荧光分子处的值 , P_{ab} 是荧光分子的吸收偶极矩 , ρ_{rad} 是荧光分子自发辐射概率 . 其中自发辐射概率 ρ_{rad} 决定了发射荧光强度的角分布. 在实际的实验 中 ,自发辐射概率 ρ_{rad} 和物镜收集角 φ 将决定荧光 的收集效率 η ,它只影响分子荧光图像间的相对强 度而不会改变单个分子像的图像分布. 利用偶极辐 射公式 $I(\theta_0, \varphi) \simeq [P_{rad}^2 - (P_{rad}^2 \cdot n)^2]$ 如图 4 所示 , 其中 $I(\theta_0, \varphi)$ 是荧光分子在 n 方向的辐射强度 , θ_0 为荧光发射偶极矩和 Z 轴的夹角 , $\varphi \ge n$ 和Z 轴的 夹角 , P_{rad} 是荧光分子的发射偶极矩. 通过积分可得 收集角为 φ 时的收集效率 η 的公式为

$$g = \frac{1}{2} - \frac{3}{8} (1 + \cos^2(\theta_0)) \cos(\varphi) - \frac{1}{8} (1 - 3\cos^2(\theta_0)) \cos^2(\varphi). \quad (8)$$

)

表 1 是我们计算的不同收集角时,发射偶极矩 P_{rad} 垂直于透镜光轴($\theta_0 = \pi/2$)和平行于透镜光轴 ($\theta_0 = 0$)时的收集效率,对于其他指向的荧光分子的 η 应在两者之间.

如果采用数值孔径为 1.4 的油镜(油折射率为 1.5)可计算得收集角为70°可见不同指向分子间收



图 4 荧光收集计算示意图

表 1 不同 θ_0, φ 时,收集效率的比较

φ	90°	80°	70°	60°	50°	40°	30°
$\eta (\theta_0 = 0)$	0.5	0.37	0.25	0.16	0.084	0.038	0.013
$\eta (\theta_0 = \pi/2)$	0.5	0.43	0.37	0.30	0.23	0.16	0.094

集效率的差别在 30% 以内,在后面的处理中忽略收 集效率对荧光图像的影响.荧光图像主要由针尖出 射场 E 和荧光分子的吸收偶极矩 P_{ab}决定.

3.2 计算结果

下面的计算中,光波以 X 方向线偏振光入射到 小孔(半径为 $\lambda/10$)上,在小孔下方 $\lambda/200$ 处放置样 品 样品折射率为 1.4. 荧光分子在样品表面下 $\lambda/$ 100 处,在扫描过程中透镜和样品及荧光分子的相 对位置不变,由小孔扫描来成像.我们分别计算,当 荧光分子吸收偶极矩沿着特定方向 X,Y,Z 轴取向 时的荧光图像,如图 5.图 5 中(a) (a) 对应沿 X 轴 取向荧光图像的三维图和等高线图;相应的(b), (b₁)对应沿 Y 轴取向 (c) (c₁)对应 Z 轴取向.

首先从几幅图的幅度来看,其中荧光分子的偶极矩指向沿 X 方向的荧光图像的幅值最大为 0.12 ,偶极矩指向沿 Y 方向的荧光图像的幅值大小 为 8×10⁻³这个结果和我们的入射光为 X 偏振是 一致的.再看一看三幅图的形状可看出图(a)和针尖 光场的 X 偏振分量的强度分布是相同的,图(b), (c)也分别对应于针尖光场的 Y、Z 偏振分量的强 度分布.因此我们知道在固定荧光分子的偶极矩指 向时可以用荧光分子作为针尖场分布的探测器,对 针尖场的性质进行研究.同时我们也计算了不规则 指向的荧光分子图像 如图 6.



图 5

(a)荧光分子吸收偶极矩沿 X 方向时荧光图像的 3D 显示 (b)荧光分子吸收偶极矩沿 Y 方向时荧光图像的 3D 显示 (c) 荧光分子吸收偶极矩沿 Z 方向时荧光图像的 3D 显示 (a) 荧光分子吸收偶极矩沿 X 方向时荧光图像的等高线图 (b_1 炭 光分子吸收偶极矩沿 Y 方向时荧光图像的等高线图 (c) 荧光分子吸收偶极矩沿 Z 方向时荧光图像的等高线图

由图 6 我们看出,荧光图像的分布是不均匀非 对称的.对应前图 2 所示的针尖场分布,我们不难想 象荧光图像不会具有轴对称,但在上图中荧光图像 关于 X 轴的对称性也被破坏了,这是由于采用的模 型是矢量模型.不难想象如果拥有原始实验数据用 上述荧光强度表达式进行参数拟合,可得到实验中 荧光分子的偶极矩指向.这模拟结果与 Betzig 等在

1993年获得的单分子荧光图像是一致的11].

4 结 论

本文通过利用经 Grober 发展的 Bethe 模型,计 算了光纤探针针尖附近的光场分布,研究了它的横 向分辨率、透射深度、透射系数等问题,其中对分辨



图 6

(a) 炭光分子吸收偶极矩沿 $\theta = 2\pi/5$, $\varphi = 2\pi/5$ 方向时荧光图像的 3D 显示 (a) 炭光分子吸收偶极矩沿 $\theta = 2\pi/5$, $\varphi = 2\pi/5$ 方向时荧光图像的等高线图

率和透射深度的研究将对如何改进实验装置,观察 样品的制备等方面有重要指导意义.同时本文模拟 了生物荧光分子成像的过程,研究了荧光分子偶极 矩方向,入射光偏振方向对信号收集的影响,发现荧 光成像是偏振极性和荧光分子取向共同作用的结 果,这些结果使我们对荧光图像的本质有了进一步 的了解,同时也为分析荧光图像提供了理论方法.

- [1] E. Betzig J. K. Trautman , Science , 257 (1992), 198.
- [2] H. Heinzelmann , D. W. Pohl , Appl. Phys. , A59 (1994) 89.
- [3] J. Jersch , F. Demming J. Hildenhagen , K. Dickmann , Optics & Laser Technology , 29 (1997) , 433.

- [4] J. Hwang ,L. Heber ,L. Margolis ,M. Edidin , *Biophys. J.*, 74 (1998), 2184.
- [5] T. Ha ,Th. Enderle ,D. F. Ogletree ,D. S. Chemla ,P. R. Selvin , S. Weiss ,Proc . Natl . Acad . Sci. USA 93 (1996) , 6264.
- [6] B. D. Terris , H. J. Mamin , D. Rugar , Appl. Phys. Lett. ,68 (1996),141.
- [7] Gui-ying Wang, Acta Physica Sinica A6(1997), 2154(in Chinese J 王桂英 物理学报 A6(1997), 2154].
- [8] R. D. Grober ,T. Rutherford ,T. D. Harris , Applied Optics ,35 (1996) ,3488.
- [9] H. A. Bethe , *Physical Review* 66(1944), 163.
- [10] C. J. Bouwkamp , Philips Res. Rep. 5(1950) 321.
- [11] E. Betzig , R. Chichester , J. Science ,262(1993),1422.

STUDY OF THE DISTRIBUTION OF LIGHT INTENSITY OF THE FIBER PROBE OF TRANSMISSION SCANNING NEAR FIELD OPTICAL MICROSCOPY AND THE DISTRIBUTION OF EXCITED FLUORESCENT MOLECULES*

WANG ZI-YANG LI QIN ZHAO JUN GUO JI-HUA⁺

 (Department of Physics , Molecular and Nano Sciences Laboratory of Education Ministry , Tsinghua University , Beijing 100084 , China))
 (Received 17 January 2000 ; revised manuscript received 11 April 2000)

ABSTRACT

The light intensity distribution near the fiber probe of the Transmission Scanning Near Field Optical Microscopy (SNOM) was calculated by the model of R. D. Grober. The resolution transmission depth and transmittance of the light intensity were discussed. The imaging process of excited biological fluorescent molecules was simulated and it was found that the dipole direction of fluorescent molecules and the polarization of incident light influenced the detected signals. Both the polarization direction of incident light and the dipole direction of fluorescent molecules would affect the fluorescent molecules imaging.

Keywords : scanning near field optical microscopy , light intensity distribution , fluorescent molecules imaging PACC : 4230 , 3115 , 0760P

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 19890380-7 and NO. 69808003). [†]Corresponding author *E*-mail opton@mail.tsinghua.edu.cn