

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此介绍, 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.

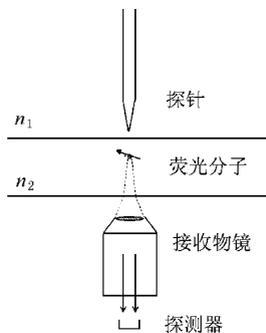


图 1 SNOM 示意图

* 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: topton@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 ($d < \lambda$) 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:

$$E(\rho, \beta, z, t) = \int_0^\infty f_{TM}(k_\rho) E_{TM}(k_\rho, \rho, \beta, z, t) dk_\rho + \int_0^\infty f_{TE}(k_\rho) E_{TE}(k_\rho, \rho, \beta, z, t) dk_\rho, \quad (1)$$

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

$$E(\rho, \beta, z, t) = \int_0^\infty f_{TM}(k_\rho) t_{TM} E_{TM}(k_\rho, \rho, \beta, z, t) dk_\rho + \int_0^\infty f_{TE}(k_\rho) t_{TE} E_{TE}(k_\rho, \rho, \beta, z, t) dk_\rho, \quad (2)$$

其中

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

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

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

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

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.

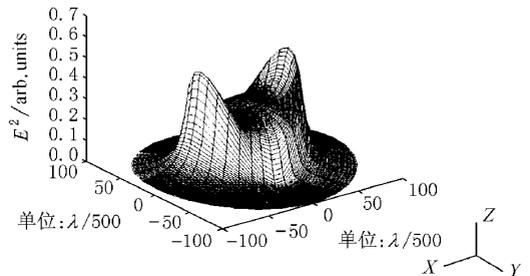


图 2 小孔半径为 $\lambda/10$ 时, 在距离小孔 $Z = \lambda/100$ 的光强 (E^2) 分布

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

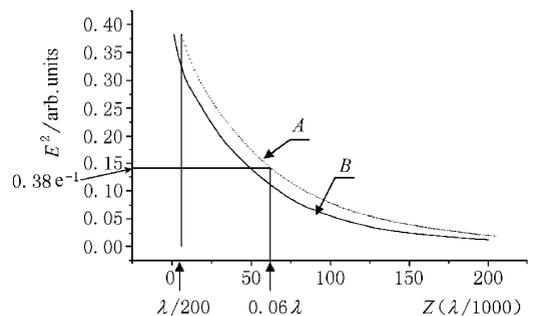


图 3 在空气和样品中光强沿 Z 轴变化的比较. A 为样品中, B 为空气中

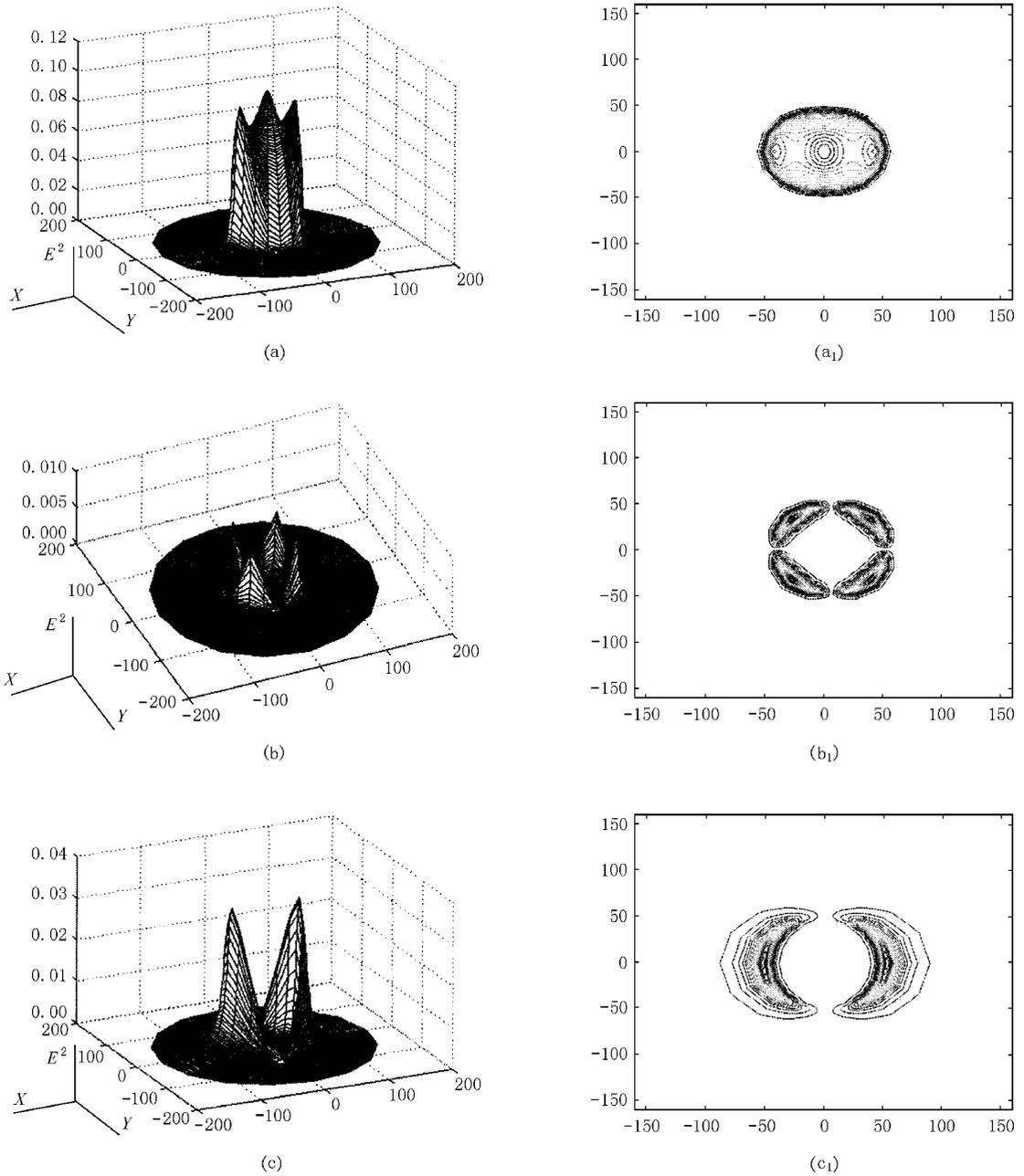


图 5

(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 (a₁) 荧光分子吸收偶极矩沿 X 方向时荧光图像的等高线图 (b₁) 荧光分子吸收偶极矩沿 Y 方向时荧光图像的等高线图 (c₁) 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

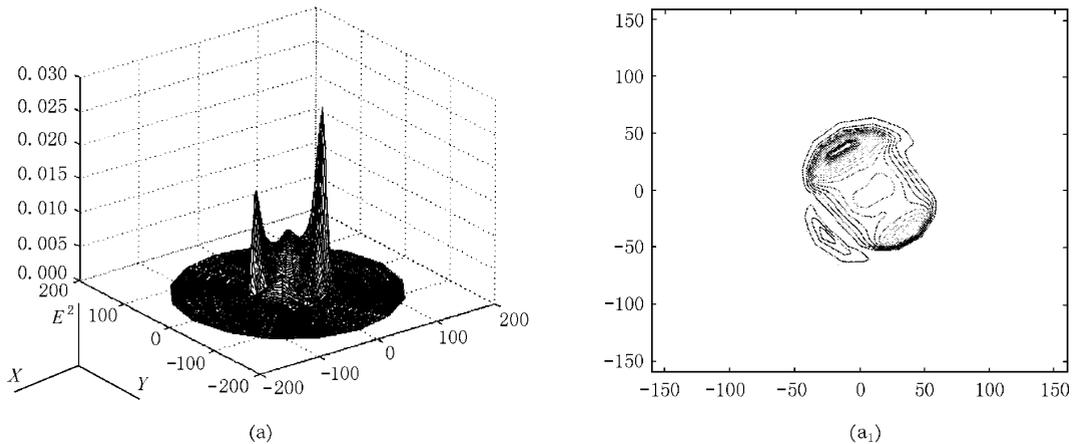


图 6

(a) 荧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

(a₁) 荧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* **46** (1997) 2154 (in Chinese) [王桂英, *物理学报* **46** (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