

# 入射光的偏振特性对 全内反射荧光显微术中荧光激发的影响\*

王 琛 袁景和 王桂英 徐至展

(中国科学院上海光学精密机械研究所强光光学开放实验室,上海 201800)

(2002 年 11 月 16 日收到,2003 年 2 月 25 日收到修改稿)

基于麦克斯韦的电磁场理论,研究了在全内反射荧光显微术中不同偏振态的入射光所产生的不同偏振的隐失场以及对不同取向的荧光分子荧光发射的影响.理论分析结果表明, $p$  偏振的入射场将产生椭圆偏振的隐失场, $s$  偏振的入射场将产生  $s$  偏振的隐失场.随着荧光分子三维取向的不同,这两种隐失场的激发荧光效率也将不同,由此引起荧光发射强度的各向异性分布.据此特性,可以实现对膜表面分子三维取向的成像.

关键词:全内反射,荧光显微术,隐失波,偏振态

PACC:0760P,0340K,0760F

## 1. 引 言

细胞膜内存在与细胞生命活动密切相关的细胞运输.长期以来,生物学家们都希望能对膜表面区域的这些运输活动进行观察,而不受来自细胞内部深层区域信号的干扰.为了实现这个目的,一种新型的基于全内反射原理的荧光显微技术发展起来,它特别适合于细胞—基底接触区域光学薄层的观察.这种全内反射荧光显微(TIRFM)技术也称隐失波显微术,它利用光波在两种折射率不同介质分界面上的全反射产生隐失场,来激发低折射率介质中的荧光.由于隐失场的独特特性,使荧光激发的区域非常靠近分界面(小于 100 nm).这样不会激发距分界面更远区域的荧光,从而可实现背景噪声极小的荧光成像,而且对低折射率介质中其他区域的光照射可减至最少.

将全反射理论与生物细胞的荧光成像技术相结合的 TIRFM 技术是一种全新的突破.虽然它的具体应用还不到 10 年的时间,但是它在单分子探测中已显示出强大的生命力.1995 年, Yanagida 小组用 TIRFM 技术首次在液体溶液中得到了荧光标记的单个蛋白质分子的成像<sup>[1]</sup>.1996 年, Moerner 小组又用这

项技术实现了限制在丙烯酸酰胺凝胶体的纳米孔中的单分子的三维成像<sup>[2]</sup>.1997 年, Pierce 等<sup>[3]</sup>利用全内反射荧光显微方法,成功地追踪到绿色荧光蛋白(GFP)运动分子沿着微管的实时运动.他们开创性的工作使得这项显微技术迅速并广泛应用于膜表面动力学以及膜表面生物化学运动的研究中,成为 21 世纪最有前途的单分子探测的光学显微术之一<sup>[4,5]</sup>.

在利用 TIRFM 技术进行成像时,主要是利用隐失场不同于传播场的强度分布特性.同时,生物物理学家们也认识到利用 TIRFM 技术中隐失场不同于一般传播场的偏振特性,将可以实现对单个分子三维取向的直接探测,这对于揭示单个分子与周围环境之间以及分子与分子之间的相互作用有着重要的意义<sup>[6,7]</sup>.在本文中,我们对隐失场的偏振性质进行了具体推导,并模拟计算了偏振的隐失场中不同取向的荧光分子的激发,得到了不同偏振光入射下荧光发射各向异性的定量分布,由此可以实现利用偏振光对膜表面分子三维取向的探测.

## 2. 全内反射的基本原理

我们知道,当光波从光密介质入射到光疏介质中时会发生折射.如果光波入射的角度大于临界角,

\*上海市科学技术发展基金(批准号:01DJJK018)、国家自然科学基金(批准号:60078025)和国家重点基础研究发展规划(批准号:2002CB713808)资助的课题.

则会发生全反射.入射角和透射角之间满足关系式(在全反射时,认为透射角为虚数)

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_t, \quad (1)$$

这里  $n_1$  是光密介质的折射率,在全内反射显微术中一般为玻璃衬底; $n_2$  是光疏介质的折射率,为生物细胞样品.

图 1 为全内反射示意图.当发生全发射时,没有能量流过界面.但这并不意味着第二介质中没有场的存在,其中仍存在着一种特殊形式的透射波电场,其表达式为<sup>[8]</sup>(振幅取为单位振幅)

$$\begin{aligned} \exp(-i\tau_1) &= \exp\left[-i\omega\left(t - \frac{x \sin \theta}{nv_2}\right)\right] \\ &\times \exp\left[\left(-\frac{\omega}{v_2} \sqrt{\frac{\sin^2 \theta_i}{n^2} - 1}\right) \cdot z\right], \quad (2) \end{aligned}$$

式中  $v_2$  是第二介质中的光速,  $n = n_2/n_1$ . (2) 式表明,发生全反射时透射波为一个非均匀波,它沿着入射面上的介质边界(即  $x$  方向)传播,而振幅随离界面的距离  $z$  作指数衰减.可以看出,透射电磁场的振幅随进入样品的深度  $z$  减小得非常快,这种电磁场只存在于界面附近一薄层内,因此,我们称此非均匀场为隐失场.其在第二介质中的有效进入深度约为

$$\begin{aligned} d &= \frac{v_2}{\omega} \left(\sqrt{\frac{\sin^2 \theta_i}{n^2} - 1}\right)^{-1} \\ &= \frac{\lambda_0}{2\pi n_2} \left(\sqrt{\frac{\sin^2 \theta_i}{n^2} - 1}\right)^{-1}, \quad (3) \end{aligned}$$

即大约是一个波长.

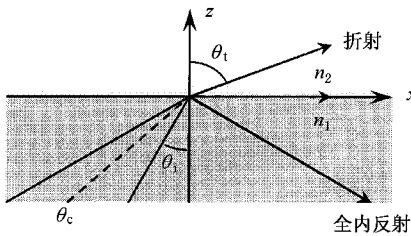


图 1 全内反射示意图

### 3. 偏振态的影响

一般文献中均没有具体讨论入射场偏振态的不同对隐失场的影响.在本文中,我们就从麦克斯韦方程出发,详细考虑不同偏振的单色光入射产生隐失场的偏振态情况(图 2).讨论中我们取  $x-z$  平面为入射面, $x-y$  平面为两种介质的分界面所在的平面.

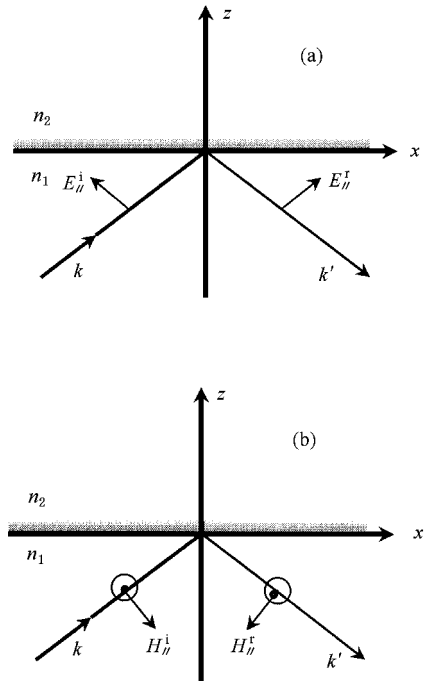


图 2 不同偏振态的单色光入射示意图 (a)p 偏振的情形 (b)s 偏振的情形

#### 3.1. $E_{//}$ 入射面(即 p 偏振)的情况

设  $E_{//}^i$  为入射场电矢量的振幅,上标  $i, r$  和  $t$  分别表示入射场、反射场和透射场,  $k$  为波传播方向上的单位矢量.入射场的各分量为

$$\begin{aligned} E_x^i &= -E_{//}^i \cos \theta_i, \\ E_z^i &= E_{//}^i \sin \theta_i, \\ E_y^i &= 0, \\ k_x^i &= k \sin \theta_i, \\ k_z^i &= k \cos \theta_i, \\ k_y^i &= 0. \end{aligned} \quad (4)$$

同时,全反射时 p 偏振的反射分量为<sup>[8]</sup>

$$\begin{aligned} E_{//}^r &= \frac{n^2 \cos \theta_i - i \sqrt{\sin^2 \theta_i - n^2}}{n^2 \cos \theta_i + i \sqrt{\sin^2 \theta_i - n^2}} E_{//}^i, \\ E_x^r &= E_{//}^r \cos \theta_i, \\ E_z^r &= E_{//}^r \sin \theta_i, \\ E_y^r &= 0, \\ k_x^r &= k \sin \theta_i, \\ k_z^r &= -k \cos \theta_i, \\ k_y^r &= 0. \end{aligned} \quad (5)$$

利用磁矢量与电矢量的关系式

$$\mathbf{H} = \sqrt{\epsilon} \mathbf{k} \times \mathbf{E},$$

可得到

$$\begin{aligned} H_x^i &= 0, \\ H_z^i &= 0, \\ H_y^i &= -\sqrt{\epsilon_1} E_{//}^i; \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} H_x^r &= 0, \\ H_z^r &= 0, \\ H_y^r &= -\sqrt{\epsilon_1} E_{//}^r. \end{aligned} \quad (7)$$

根据边界连续条件

$$\begin{aligned} E_x^i + E_x^r &= E_x^t, \\ E_y^i + E_y^r &= E_y^t, \\ H_y^i + H_y^r &= H_y^t, \end{aligned}$$

我们可以直接得到透射电场的  $x, y$  分量

$$\begin{aligned} E_x^t &= (E_{//}^i + E_{//}^r) \cos \theta_i \\ &= -\frac{2i \sqrt{\sin^2 \theta_i - n^2}}{n^2 \cos \theta_i + i \sqrt{\sin^2 \theta_i - n^2}} E_{//}^i \cos \theta_i, \\ E_y^t &= 0. \end{aligned} \quad (8)$$

同时,再次利用磁矢量与电矢量的关系式

$$\mathbf{E} = \frac{1}{\sqrt{\epsilon}} \mathbf{k} \times \mathbf{H},$$

可得到透射场电矢量的  $z$  分量

$$\begin{aligned} E_z^t &= \frac{1}{\sqrt{\epsilon_2}} H_y^t = -\frac{\sqrt{\epsilon_1}}{\sqrt{\epsilon_2}} (E_{//}^i + E_{//}^r) \\ &= -\frac{2n \cos \theta_i}{n^2 \cos \theta_i + i \sqrt{\sin^2 \theta_i - n^2}} E_{//}^i. \end{aligned} \quad (9)$$

由以上的讨论我们可看出,当入射光波为  $p$  偏振的线偏光时,全内反射时形成的隐失场只有平行分量,即  $x, z$  分量.而且,  $x$  分量和  $z$  分量之间相差一个虚数单位  $i$ ,这表明两者在相位上相差  $\frac{\pi}{2}$ ,所以合成的偏振光将是一个正椭圆偏振光,其偏振矢在  $x-z$  平面即入射面内旋转.

### 3.2. $E \perp$ 入射面(即 $s$ 偏振)的情况

设  $E_{\perp}^i$  为入射场电矢量的振幅,根据菲涅耳透射率公式,透射场的电矢量为<sup>[8]</sup>

$$E_y^t = \frac{2n_1 \cos \theta_i}{n_1 \cos \theta_i + n_2 \cos \theta_t} E_{\perp}^i \quad (10)$$

其中发生全反射时  $\cos \theta_t$  ( $\theta_t$  为透射角)的表达式为

$$\sin \theta_t = \frac{\sin \theta_i}{n},$$

$$\cos \theta_t = i \sqrt{\frac{\sin^2 \theta_i}{n^2} - 1}. \quad (11)$$

将(11)式代入(10)式,可得到透射分量为

$$E_y^t = \frac{2 \cos \theta_i}{\cos \theta_i + i \sqrt{\sin^2 \theta_i - n^2}} E_{\perp}^i. \quad (12)$$

当入射光波为  $s$  偏振的线偏光时,全内反射形成的隐失场只有垂直分量,即  $y$  分量.

## 4. 偏振的隐失场中荧光的发射

下面我们在简化的模型下,具体地分析偏振的隐失场中的荧光发射.

我们采用文献[9]提出的荧光发射模型,并在此基础上进行修正.假设入射光在低折射率介质中的透射成分(即隐失场)局域在  $z=0$  和  $z=d_{\text{eff}}(\theta_i)$  之间,则在这段距离内激发的荧光强度为<sup>[9]</sup>

$$F = \frac{A_i}{\cos \theta_i} \int_0^{d_{\text{eff}}} \phi(Z) \cdot \alpha(z) \cdot C(Z) \cdot I(Z, \theta_i) dZ, \quad (13)$$

$$I(Z, \theta_i) = I(0, \theta_i) \exp[-Z/d_{\text{eff}}(\theta_i)], \quad (14)$$

式中,  $\phi(Z)$  为荧光团的量子产率,  $\alpha(Z)$  为荧光团的摩尔消光比,  $C(Z)$  是荧光团的浓度,  $I(Z, \theta_i)$  为距分界面  $Z$  处的隐失场强度,  $A_i$  为入射光的横截面积,  $\frac{A_i}{\cos \theta_i}$  为入射光在界面处的照明面积.如果荧光团的量子产率和消光比近似与全内反射的界面性质及空间取向无关,即  $\phi(Z) \cdot \alpha(Z) = \phi \cdot \alpha$ ,同时  $0$  与  $d_{\text{eff}}(\theta_i)$  之间的荧光团分布可看成是均匀的,即  $C(Z) = C$  (13)式可简写成

$$\begin{aligned} F &= K \int_0^{d_{\text{eff}}} I(Z, \theta_i) dZ, \\ K &= \frac{A_i}{\cos \theta_i} \phi \cdot \alpha \cdot C. \end{aligned} \quad (15)$$

但是在这个模型中没有考虑荧光跃迁偶极子(吸收或发射偶极子)的取向问题.假设在我们观察的时间  $\Delta t$  内,吸收偶极子和发射偶极子近似地认为是平行的<sup>[10]</sup>,那么我们只需要考虑吸收偶极子的取向.

以  $(\theta', \phi)$  来标记荧光团吸收偶极子的取向(图3)则任意取向的吸收偶极子  $\mu^{ab}$  可表示为<sup>[11]</sup>

$$\begin{aligned} \mu^{ab}(\theta', \phi) &= \mu_x \mathbf{x} + \mu_y \mathbf{y} + \mu_z \mathbf{z} \\ &= \mu(\sin \theta' \cos \phi \mathbf{x} + \sin \theta' \sin \phi \mathbf{y} + \cos \theta' \mathbf{z}). \end{aligned}$$

同时将透射电场的各分量写成

$$E_x^t = \alpha_x E^t,$$

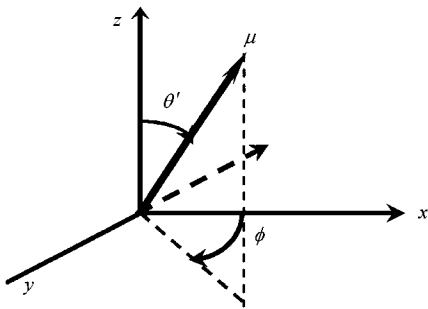


图 3 偶极子取向示意图

$$E_y^i = \alpha_y E^i,$$

$$E_z^i = \alpha_z E^i.$$

则偶极子在电场  $E^i$  中被激发的可能性(即效率)为

$$\eta = |\mu^{ab} \cdot \alpha|^2 = |\mu_x \cdot \alpha_x + \mu_y \cdot \alpha_y + \mu_z \cdot \alpha_z|^2. \quad (16)$$

所有取向的偶极子总的荧光发射强度

$$F = K \int \eta \cdot I(Z, \theta_i) dZ d\Omega, \quad (17)$$

$$d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi.$$

取向为  $(\theta', \phi)$  的偶极子发射的荧光强度为

$$F(\theta', \phi) = K \int_0^{d_{\text{eff}}} \eta \cdot I(Z, \theta_i) dZ. \quad (18)$$

对于 p 偏振的隐失场激发效率

$$\eta = |\mu^{ab} \cdot \alpha|^2 = |\mu_x \cdot \alpha_x + \mu_z \cdot \alpha_z|^2 = (\mu_x \alpha_x)^2 + (\mu_z \alpha_z)^2.$$

由于  $E_x$  和  $E_z$  相差一个虚数单位  $i$ , 导致系数  $\alpha_x$  和  $\alpha_z$  之间也相差一个虚数单位  $i$ , 所以乘积中没有交叉项. 这样, 我们观察到的取向为  $(\theta', \phi)$  的偶极子发射的荧光强度为

$$F_p(\theta', \phi) = K \int \left[ (\mu_x \alpha_x)^2 + (\mu_z \alpha_z)^2 \right] \times K(0, \theta_i) \cdot \exp\left(-\frac{z}{d_{\text{eff}}}\right) dZ. \quad (19)$$

同理, 对于 s 偏振的隐失场激发效率

$$\eta = |\mu^{ab} \cdot \alpha_s|^2 = (\mu_y \alpha_y)^2,$$

其取向为  $(\theta', \phi)$  的偶极子发射的荧光强度为

$$F_s(\theta', \phi) = K \int (\mu_y \alpha_y)^2 \cdot K(0, \theta_i) \cdot \exp\left(-\frac{z}{d_{\text{eff}}}\right) dZ. \quad (20)$$

图 4 和图 5 均是在入射角  $\theta_i = 70^\circ$  相对折射率  $n = n_2/n_1 = 0.86$ , 入射波长  $\lambda = 532 \text{ nm}$  的典型参数条件下进行模拟计算得到的隐失场激发荧光的强度分布.

从图 4 可看出, p 偏振的入射光照明时, 所产生的隐失场在取向  $\theta = 0$  和  $\theta = \pi$  上激发的荧光强度最强, 即隐失场对这两个取向的偶极子激发效率最高, 这个方向正是  $z$  向. 在取向为  $\theta = \pi/2$  上(即平行于  $x$ - $y$  的平面)激发的荧光强度为最小. 同时, 在这个方向上  $\phi$  的变化引起荧光强度小的波动, 这种波动在  $\phi = 0, \pi$  时达到极大值, 在  $\phi = \frac{\pi}{2}, \frac{3\pi}{2}$  时达到极小值. 这是因为 p 偏振入射的情形下隐失场的偏振主要在  $z$  向上, 在  $x$  方向只有很小的分量.

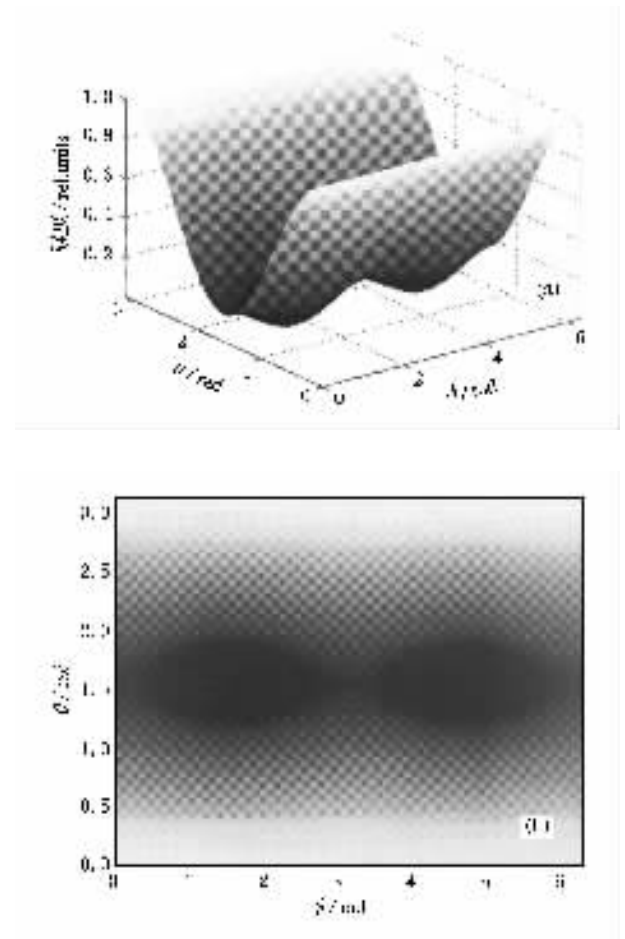


图 4 p 偏振的入射光产生的隐失场激发荧光的强度分布图 (a) 为发射荧光强度与偶极子取向关系的三维立体图 (b) 为发射荧光强度与偶极子取向关系的平面投影图

从图 5 可看出, s 偏振的入射光照明时, 所产生的隐失场在取向为  $\theta = \frac{\pi}{2}, \phi = \frac{\pi}{2}$  和  $\theta = \frac{\pi}{2}, \phi = \frac{3\pi}{2}$  上激发的荧光强度最强. 即隐失场对这两个取向的偶极子激发效率最高, 而这两个方向正是  $y$  轴所在的方向, 与隐失场的偏振方向一致. 随着偶极子的取向逐渐偏离隐失场的偏振方向, 激发效率下降, 激发的荧光强度逐渐减弱.

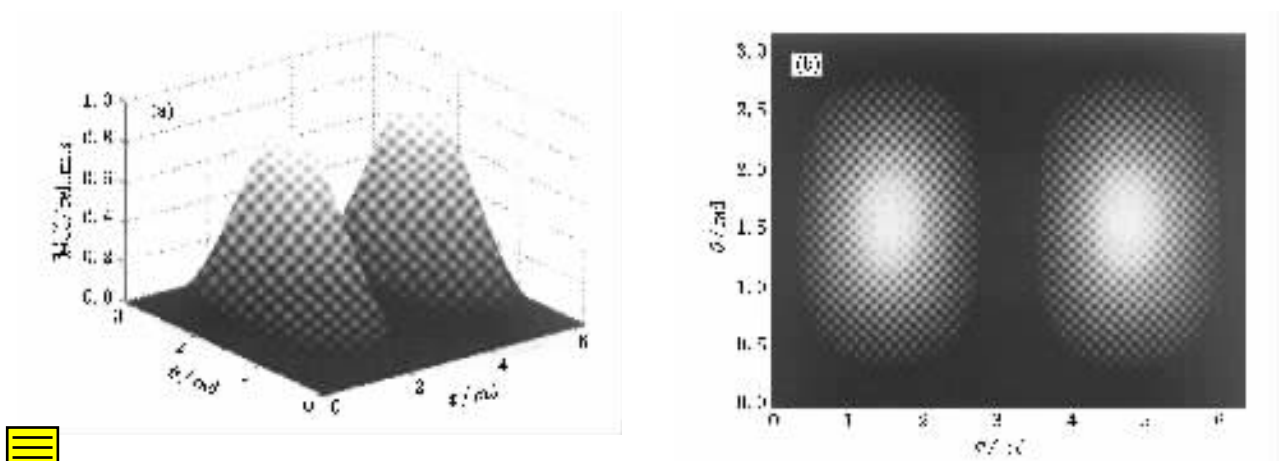


图 5  $s$  偏振的入射光产生的隐失场激发荧光的强度分布图 (a)为发射荧光强度与偶极子取向关系的三维立体图 (b)为发射荧光强度与偶极子取向关系的平面投影图

## 5. 结 论

我们分析计算的结果表明,在 TIRFM 技术中,入射光的偏振特性将会对荧光发射产生很大的影响,导致荧光发射的各向异性。 $p$  偏振的入射光产生的是椭圆偏振的隐失场,且电场的主要分量为  $z$  方向.这个隐失场将优先激发  $z$  轴取向的偶极子,而对平行于两种介质分界面(即  $x$ - $y$  平面)取向的偶极子激发效率最低.相反, $s$  偏振的入射光产生的是  $s$  偏振的隐失场,这个隐失场则优先激发平行于  $y$  轴取

向的偶极子,而对取向平行于入射面的偶极子激发效率最低.

生物学的研究表明,一些重要的生命活动过程例如细胞内吞作用(包吞)、胞外分泌(包吐)和细胞表面的输运均与膜取向的变化相关,又如细胞内的能量传递密切依赖于供体和受体之间的相对取向.利用 TIRFM 技术中独特的偏振特性,这些取向在一定尺寸范围内有序排列的变化将引起荧光发射强度的空间变化,从而被探测到.所以,这一特性可以用来对活细胞表面取向的亚显微结构进行成像,进一步提高系统的分辨率.

- [ 1 ] Takashi F, Yoshie H, Mokko T *et al* 1995 *Nature* **374** 555
- [ 2 ] Dickson R M, Norris D J, Tzeng Y L *et al* 1996 *Science* **274** 966
- [ 3 ] Pierce D W, Hom-Booher N, Valt R D 1997 *Nature* **388** 338
- [ 4 ] Yoshikazu S, Tomomi T, Kazuo S *et al* 2002 *FEBS Lett.* **512** 235
- [ 5 ] Axelrod D 2001 *Traffic* **2** 764
- [ 6 ] Ha T, Enderle T, Chemla D J 1996 *Phys. Rev. Lett.* **77** 397
- [ 7 ] Ha T, Glass J, Enderle T *et al* 1998 *Phys. Rev. Lett.* **80** 2093
- [ 8 ] Born M, Wolf E 1999 *Principles of Optics* 7th ed (London: Cambridge University Press) pp49—54
- [ 9 ] Reichert W H, Truskey G A 1990 *J. Cell. Sci.* **96** 219
- [ 10 ] Sund S E, Swanson J A, Axelrod D 1997 *Biophys. J.* **77** 2266
- [ 11 ] Dickson R M, Norris D J, Moerner W E 1998 *Phys. Rev. Lett.* **81** 5322

# The influence of polarized light on fluorescence emission in total internal reflection microscopy<sup>\*</sup>

Wang Chen Yuan Jing-He Wang Gui-Ying Xu Zhi-Zhan

( *Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics , Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 201800 , China* )

( Received 16 November 2002 ; revised manuscript received 25 February 2003 )

## Abstract

Based on Maxwell equations , we have discussed the different evanescent fields made by excitation with different polarized incident fields , and their influence on fluorescence emission. Our analysis showed that the incident light of p-polarization produces an elliptically polarized evanescent field ; at the same time , the incident light of s-polarization produces a pure s-polarization evanescent field. The probability of the excitation of fluorescent molecules by an evanescent wave varies with the fluorescent molecules orientation , which will in turn result in the anisotropic fluorescence emission .

**Keywords** : total internal reflection , fluorescence , evanescent wave , polarization

**PACC** : 0760P , 0340K , 0760F

---

<sup>\*</sup> Project supported by the Science and Technology Development Foundation of Shanghai , China ( Grant No. 01DJGK018 ) , the National Natural Science Foundation of China ( Grant No. 60078025 ) , and the State Key Development Program for Basic Research of China ( Grant No. 2002CB713808 ) .