

文章编号: 0253-2239(2007)05-0766-5

离焦系统下的单分子三维取向研究*

王金媛 王琛 刘力 王桂英

(中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800)

摘要: 提出了一种新思路来确定单分子的三维取向,在全内反射荧光显微成像的基础上,在显微镜的油镜上加一个水层,水和油的折射率不同造成光程差,产生离焦,利用全内反射产生隐失波激发了单分子的纵向分量,并在探测器前增加了一个分光镜,把光路分成偏振方向相互垂直的两束光,使得探测器上的光场分布包含单分子三维取向的信息。推导了隐失场激发的偶极矩光场在探测器上的光强分布表达式,通过分析偏振方向相互垂直的两束光在探测器上的不同的强度分布,来判断单分子偶极矩的三维取向。

关键词: 原子与分子物理; 单分子取向; 离焦显微术; 全内反射; 隐失波

中图分类号: O434.12 文献标识码: A

Imaging Three-Dimensional Single Molecule Orientations by Defocused Microscopy

Wang Jinyuan Wang Chen Liu Li Wang Guiying

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

Abstract: A new method is proposed for determination of three-dimensional orientation of the transition dipoles of single molecules. Water layer is added upon the immersion mirror objective on the total internal reflection fluorescence microscopy. The different indices of refraction between water and oil can lead to optical path difference resulting in defocused imaging. A polarization-displacement prism was added before CCD. Beam was split according to the polarization-displacement prism. The field distribution on the CCD includes the information about the orientation of single molecules. Exact field distribution excited by evanescent waves in CCD was considered. The three-dimensional orientation of single molecule was obtained by analyzing the different images of the orthogonal polarization of light.

Key word: atomic and molecular physics; orientation of single molecules; defocused microscopy; total internal reflection; evanescent wave

1 引 言

单分子探测可以揭示被系综平均掩盖的单个分子特性,反映细胞异质微环境。单分子探测的飞快发展推动着包括生命科学在内的许多学科向更广阔的领域发展。而单分子的三维取向即偶极矩三维取向作为单分子的一个重要特性,可以影响单分子的荧光强度、荧光的量子产率、荧光寿命等^[1],在量子

光学、材料物理、物理化学、分子生物学等领域都有广阔的应用前景。1993年贝尔实验室首次用近场扫描的方法探测了单分子的取向,揭开了单分子取向研究的序幕^[1]。

近来,共焦显微、离焦、层析成像、近场扫描、全内反射荧光显微成像等探测方法都被用于单分子三维取向的探测。采用全内反射可以利用隐失场激发

* 国家重大基础研究 973(2002BC713808)和国家自然科学基金(60408007)资助课题。

作者简介: 王金媛(1982-),女,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事单分子三维取向方面的研究。

E-mail: wjyuan_2000@163.com

导师简介: 刘力(1970-),女,安徽合肥人,副研究员,主要从事高分辨光学仪器设计方面的研究。

E-mail: lily_liu@mail.siom.ac.cn

收稿日期: 2006-05-09; 收到修改稿日期: 2006-08-16

荧光分子来引入纵向分量且降低背景噪声，而离焦的方法使探测器上的光强分布包含偶极矩的方位信息，通过不同取向的偶极矩在探测器上的光强分布不同来判断偶极矩的取向。对于平面内取向的单分子则通过把光路分成偏振方向垂直的两束来提高探测效率。Martin Böhmer^[3], Jörg Enderlein^[4], Robert M. Dickson^[5]和 Andrew P. Bartko^[6,7]曾提过类似的方法，但前者使用落射式照明，没有激发偶极矩的纵向分量，因此只能探测平面内的单分子取向。后者则不能探测单分子的平面内取向。本文提出了一种采用全内反射和离焦相结合的探测方法确定单分子的三维取向，利用全内反射产生隐失波激发了单分子的纵向分量，并在探测器前增加了一个分光镜，把光路分成偏振方向相互垂直的两束光，当偶极矩取向不同时，这两束光在探测器上形成的光强分布不同，因此可同时确定偶极矩的三维取向。

2 原 理

2.1 隐失场理论

光从折射率较高的介质射向折射率较低的介质时，若入射角 θ_i 大于临界角 θ_c ，就会发生全反射，如图 1 所示，在折射率低的介质界面上产生隐失波。隐失波为非均匀场，在沿着界面的方向为传播波，在垂直于界面的方向为瞬逝场，其表达式为^[8]

$$I(z) = I_0 \exp(-z/d), \quad (1)$$

其中 I_0 为界面处隐失场强度， d 为深度

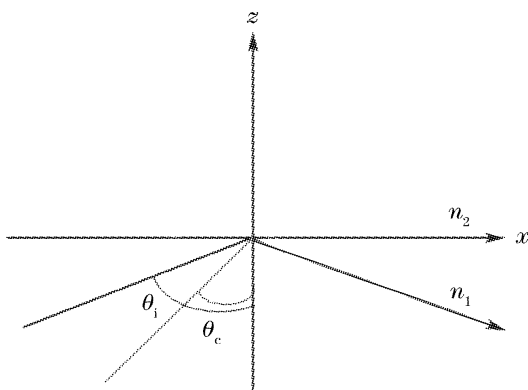


图 1 全内反射示意图

Fig. 1 Schematics of total internal reflection

$\theta, \cos \theta$), 它的取向 (θ, ϕ) , 其中 θ 为极角, ϕ 为方位角。如果考虑光场的传播, 则可由菲涅耳公式得^[10]

$$\mathbf{E}_D(\mathbf{r}) = \frac{i}{2\pi\epsilon_1} \iint \frac{d\mathbf{q}}{\omega_1} \mathbf{E}_1 \exp[i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) + i\omega_2 |z - z_0|]. \quad (4)$$

其中 $\mathbf{E}_D(\mathbf{r})$ 为偶极矩的激发光传播到界面后的光场分布, (\mathbf{r}_0, z) 和 (\mathbf{r}, z) 分别为偶极矩和所计算点的位置坐标, \mathbf{q} 为空间矢量, ω_2 为介质 n_2 的角频率, ϵ_1 为介电常量。若考虑在不同折射率介质中的折射问题, 如图 2 所示, 则可进一步得到

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 \theta_i - n_2^2)^{1/2},$$

与入射角 θ_i 和相对折射率有关, λ_0 为入射光波长, n_1, n_2 分别为两介质折射率, 且 $n_1 > n_2$ 。

隐失场强度随着渗透距离的增加呈指数形式衰减, 因此只能激发距离界面几百纳米深度的荧光分子, 引进 z 轴方向的同时大大降低了噪声。隐失场的偏振态与入射场有关, 当入射场为 p 偏振的线偏振光时, 隐失场只有 x, z 分量, 当入射光为 s 偏振时, 则隐失场只有 y 轴向的分量。如图 2 所示, 入射光方向为 s_1, p_1 , 折射光方向为 s_2, p_2, s_1 和 s_2 同方向。若入射光为单位的圆偏振光, 则隐失场表达式为^[9]

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_e &= E_{ex} \hat{x} + E_{ey} \hat{y} + E_{ez} \hat{z}, \\ E_{ex} &= -\frac{2i(\sin^2 \theta_i - n^2)^{1/2}}{n^2 \cos \theta_i + i(\sin^2 \theta_i - n^2)^{1/2}}, \\ E_{ey} &= \frac{2 \cos \theta_i}{\cos \theta_i + i(\sin^2 \theta_i - n^2)^{1/2}}, \\ E_{ez} &= -\frac{2n \cos \theta_i}{n^2 \cos \theta_i + i(\sin^2 \theta_i - n^2)^{1/2}}, \end{aligned}$$

式中 n 为相对折射率, $n = n_1/n_2$ 。

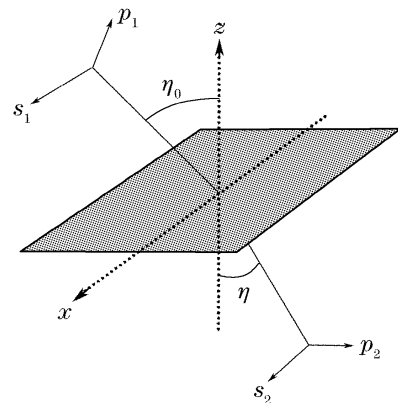


图 2 偶极矩激发电场的传播

Fig. 2 Emitted field of transition dipoles

2.2 偶极矩的激发电场在介质中传播

用圆偏振光产生的隐失场来激发偶极矩, 产生的激发电场为

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_1 &= \mathbf{E}_e \cdot \mathbf{p} = \\ &E_{ex} \cos \phi \sin \theta + E_{ey} \sin \phi \sin \theta + E_{ez} \cos \theta, \end{aligned} \quad (3)$$

其中偶极矩取向的单位矢量为 $\mathbf{p}(\cos \phi \sin \theta, \sin \phi \sin \theta, \cos \theta)$

$$\mathbf{E}_D = \frac{i}{2\pi\epsilon_1} \iint \frac{d\mathbf{q}}{\omega_1} \left[T_p \left(E_x \cos \phi \sin \theta \cdot \frac{\cos \eta}{\cos \eta_0} \hat{\mathbf{x}} + E_z \sin \phi \sin \theta \cdot \frac{\sin \eta}{\sin \eta_0} \hat{\mathbf{z}} \right) + T_s \cdot E_y \cos \theta \hat{\mathbf{y}} \right] \times \exp[i\mathbf{q} \cdot (\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_0) + i\omega_2 |z - z_0|], \quad (5)$$

其中 ω_1 为在介质 n_1 的波数, η, η_0 分别为入射光和折射光在界面上与光轴的夹角。则

$$\mathbf{E}_{Dx} = \frac{i}{2\pi\epsilon_1} \iint \frac{d\mathbf{q}}{\omega_1} T_p E_x \hat{\mathbf{x}} \cos \phi \sin \theta \cdot \frac{\cos \eta}{\cos \eta_0} \times \exp[i\mathbf{q} \cdot (\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_0) + i\omega_2 |z - z_0|],$$

$$\mathbf{E}_{Dz} = \frac{i}{2\pi\epsilon_1} \iint \frac{d\mathbf{q}}{\omega_1} T_p E_z \hat{\mathbf{z}} \sin \phi \sin \theta \cdot \frac{\sin \eta}{\sin \eta_0} \times \exp[i\mathbf{q} \cdot (\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_0) + i\omega_2 |z - z_0|],$$

$$\mathbf{E}_{Dy} = \frac{i}{2\pi\epsilon_1} \iint \frac{d\mathbf{q}}{\omega_1} T_s E_y \hat{\mathbf{y}} \cos \theta \times \exp[i\mathbf{q} \cdot (\boldsymbol{\rho} - \boldsymbol{\rho}_0) + i\omega_2 |z - z_0|],$$

其中 T_s, T_p 分别为 s 偏振光和 p 偏振光的菲涅耳折射率, $\boldsymbol{\rho}, \boldsymbol{\rho}_0$ 分别为离焦和非离焦下入射点到物镜中心距离与物镜半径的比值。 $\cos \eta / \cos \eta_0$ 和 $\sin \eta / \sin \eta_0$ 因子描述了折射前后 p 偏振光的偏振态发生了变化。

3 单分子激发光场在探测器上的光强分布

通常用高数值孔径的物镜来对单分子成像,其焦距的高度对准使图像锐利、清晰,但损失了三维的方向信息,通过稍微的离焦引入像差可以有效地引进三维方向信息。

图 3 为离焦的成像系统。通过圆偏振光产生的隐失场激发偶极矩,产生与偶极矩三维取向有关的电场分布,然而需要分子非常接近界面。单个不可移动的分子被激发,单分子荧光从界面以与光轴 η 角入射到物镜,再以与光轴 η' 的夹角入射到探测面上。由于在油镜上加一个与油镜折射率不匹配的水层,当单分子的激发光场通过水层时则产生光程差,导致离焦。

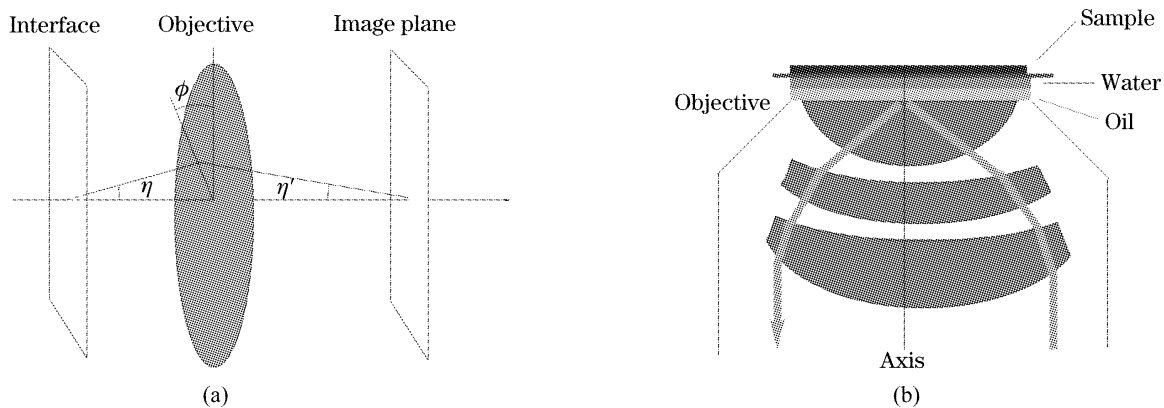


图 3 离焦的成像系统。(a)从界面到 CCD 上的成像光路图,(b)局部图

Fig. 3 Schematic of the imaging geometry. (a) Geometry of the imaging from the interface onto the CCD camera, (b) local setup

光程差计算式为^[11]

$$L = n_{\text{water}} t_{\text{water}} [1 - (NA \cdot \rho / n_{\text{water}})^2]^{1/2} - n_{\text{oil}} t_{\text{water}} [1 - (NA \cdot \rho / n_{\text{oil}})^2]^{1/2}, \quad (6)$$

其中 t_{water} 为水层厚度, n_{water} 为水层的折射率, n_{oil} 为油层的折射率, NA 为物镜数值孔径, $\rho = R' / R'_{\text{max}}$, R' 为光入射到物镜时距光轴距离, R'_{max} 为物镜半径。

单分子的荧光光场通过离焦的光学系统在探测器上成像,不考虑物镜对光场偏振态的影响,根据基尔霍夫描述可以得出

$$\mathbf{E} = M \iint_{\Omega} d\Omega' \left(\frac{n' \cos \eta'}{n \cos \eta} \right)^{1/2} \mathbf{E}_D \exp(ik's' \cdot \mathbf{r}' + ik \cdot L \cos \eta), \quad (7)$$

其中 \mathbf{r}' 为探测器上所计算点的位置坐标,即 (\mathbf{R}', z') , \mathbf{R}' 为所计算点位置在像平面上的二维矢量,大小为 R' ; n 和 n' 分别为物空间和像空间的折射率,在系统中 n 即为 n_{oil} ; M 为物镜放大倍数, $M(n' \cos \eta' / n \cos \eta)^{1/2}$ 因子保证了能量守恒; k, k' 分别为物空间和像空间的波矢;积分空间 $\Omega(\eta', \phi)$ 为方位角, ϕ 取值为 $0 \sim 2\pi$, η' 取值为 $0 \sim \eta'_{\text{max}}$ 。由 $n \sin \eta = M n' \sin \eta'$ 可得: $\eta'_{\text{max}} = \arcsin(NA / M n')$ 。则积分可得

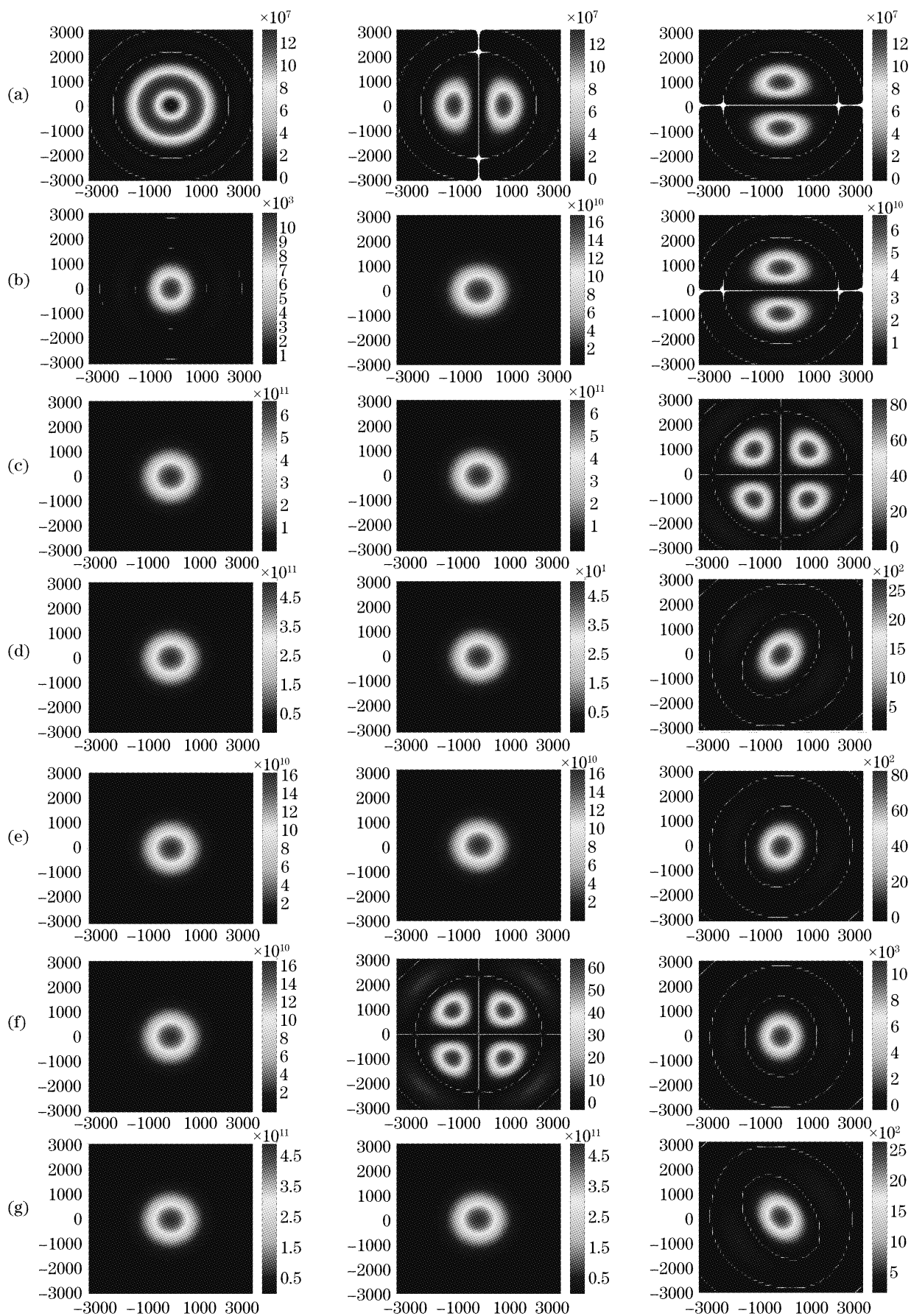


图 4 不同偶极矩的离焦图像。

Fig. 4 Defocused images of different dipoles.

(a) $(0^\circ, 0^\circ)$, (b) $(45^\circ, 45^\circ)$, (c) $(90^\circ, 0^\circ)$, (d) $(90^\circ, 30^\circ)$, (e) $(90^\circ, 60^\circ)$, (f) $(90^\circ, 90^\circ)$, g $(90^\circ, 150^\circ)$

$$E_x = i \sin \theta \cos \phi \int_0^{\eta'_{\max}} d\eta' \sin \eta' \left(\frac{\cos \eta'}{n \cos \eta} \right)^{1/2} \times$$

$$[\cos \eta' (J_0 - J_2 \cos 2\psi) E_{D_x} + (J_0 + J_2 \cos 2\psi) E_{D_y} + i \cos \theta \cos \eta' \cos \phi J_1 \cdot E_{D_z}], \quad (8)$$

$$E_y = i \sin \theta \cos \phi \int_0^{\eta'_{\max}} d\eta' \sin \eta' \left(\frac{\cos \eta'}{n \cos \eta} \right)^{1/2} (-\cos \eta' J_2 \sin 2\psi E_{D_x} + J_2 \sin 2\psi \cdot E_{D_y} + i \cos \theta \cos \eta' \sin \phi J_1 \cdot E_{D_z}),$$

其中 ψ 为计算点在探测器上的位置与 x 轴间的夹角,那么探测器上总的光强分布为

$$I = I_x + I_y = |E_x|^2 + |E_y|^2, \quad (9)$$

(8)式和(9)式描述了偶极矩被激发的荧光经过水层离焦后,在探测器上的光强分布。图4是偶极矩取向不同时探测器上的光强分布图,左边第一列表示总的光强分布,后两列为把荧光分成 x, y 偏振后的光强分布。我们取的参量为 $M=100, n=1.5, NA=1.4, n_{\text{water}}=1.43, n'=1, t_{\text{water}}=0.5 \mu\text{m}$, 此时光程差为几百纳米, $\lambda=488 \text{ nm}$ 。可以清楚看到,当偶极矩为 z 轴取向,即 $\theta=0$ 时,探测器上的光强分布为圆环形状,偶极矩有水平取向时,把光路分成 x, y 偏振方向的两束光,此时 x, y 偏振方向的光强分布发生了明显变化;当偶极矩为 xy 平面内取向,即 $\theta=90^\circ$ 时,光强分布为一个近似衍射的圆斑状,在方位角 ϕ 不同时, x, y 偏振方向的光强分布明显不同,以此可以来判断平面内偶极矩的不同方位角 ϕ (取值范围为 $0 \sim \pi$)。

4 结 论

采用圆偏振光在界面全内反射产生的隐失波激发荧光分子的离焦系统来探测单分子的三维取向,隐失波作为激发光场使得荧光分子纵向分量被激发,使得纵向分量在探测器的光强分布中被表达。当偶极矩为 z 轴方向时,探测器上的光强分布为环状,而偶极矩在 xy 平面内取向时探测器上光强分布为一圆斑。为了探测偶极矩平面内的取向,把光路分成偏振方向垂直的两支,根据 xy 平面内不同取向的光强分布,可以很容易确定偶极矩平面内的取向。隐失场激发使照明局限在一个薄层区域,从而减小背景荧光,大大提高了信噪比。使用高数值孔径的物镜能更方便地产生隐失场,同时提高系统的分辨力及增大荧光的收集效率,并且全内反射显微

不需要扫描成像,大大提高了成像速度。必须指出,该方法是基于等光程成像的理论,没有考虑物镜对入射光偏振态的影响,并且假设荧光分子是非光降解的,偶极矩取向改变的时间大于探测时间。

参 考 文 献

- 1 M. Kreiter, M. Prummer, B. Hecht *et al.*. Orientation dependence of fluorescence lifetimes near an interface[J]. *J. Chem. phys.*, 2002, **117**(20): 9430~9433
- 2 Raoul Kopelman, Weihong Tan. Near-field optics: imaging single molecules[J]. *Science*, 1993, **262**(5138): 1382(1)~1382(3)
- 3 Martin Böhmer, Jörg. Enderlein. Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy[J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2003, **20**(3): 554~559
- 4 Jörg Enderlein. Theoretical study of detection of a dipole emitter through an objective with high numerical aperture[J]. *Opt. Lett.*, 2000, **25**(9): 634~636
- 5 Robert M. Dickson, D. J. Norris, W. E. Moerner. Simultaneous imaging of individual molecules aligned both parallel and perpendicular to the optic axis[J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1998, **81**(24): 5322~5325
- 6 Andrew P. Bartko, Robert M. Dickson. Three-dimensional orientations of polymer-bound single molecules[J]. *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**(16): 3053~3056
- 7 Andrew P. Bartko, Robert M. Dickson. Imaging three-dimensional single molecule orientations[J]. *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**(51): 11237~11241
- 8 P. A. Temple. Total internal reflection microscopy: a surface inspection technique[J]. *Appl. Opt.*, 1981, **20**(15): 2656~2664
- 9 Wang Chen, Yuan Jinghuo, Wang Guiying *et al.*. The influence of polarized light on fluorescence emission in total internal reflection microscopy[J]. *Acta Physica Sinica*, 2003, **52**(12): 3014~3018 (in Chinese)
- 王 琛,袁景和,王桂英等. 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[J]. *物理学报*, 2003, **52**(12): 3014~3018
- 10 You Mingjun. *Fourier Optics* [M]. Beijing: The Publishing House of Ordnance Industry, 2000. 84~103 (in Chinese)
- 游明俊. 傅立叶光学[M]. 北京: 兵器工业出版社, 2000. 84~103
- 11 Sarah Frisken Gibson, Frederick Lanni. Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy[J]. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1991, **8**(10): 1601~1613