

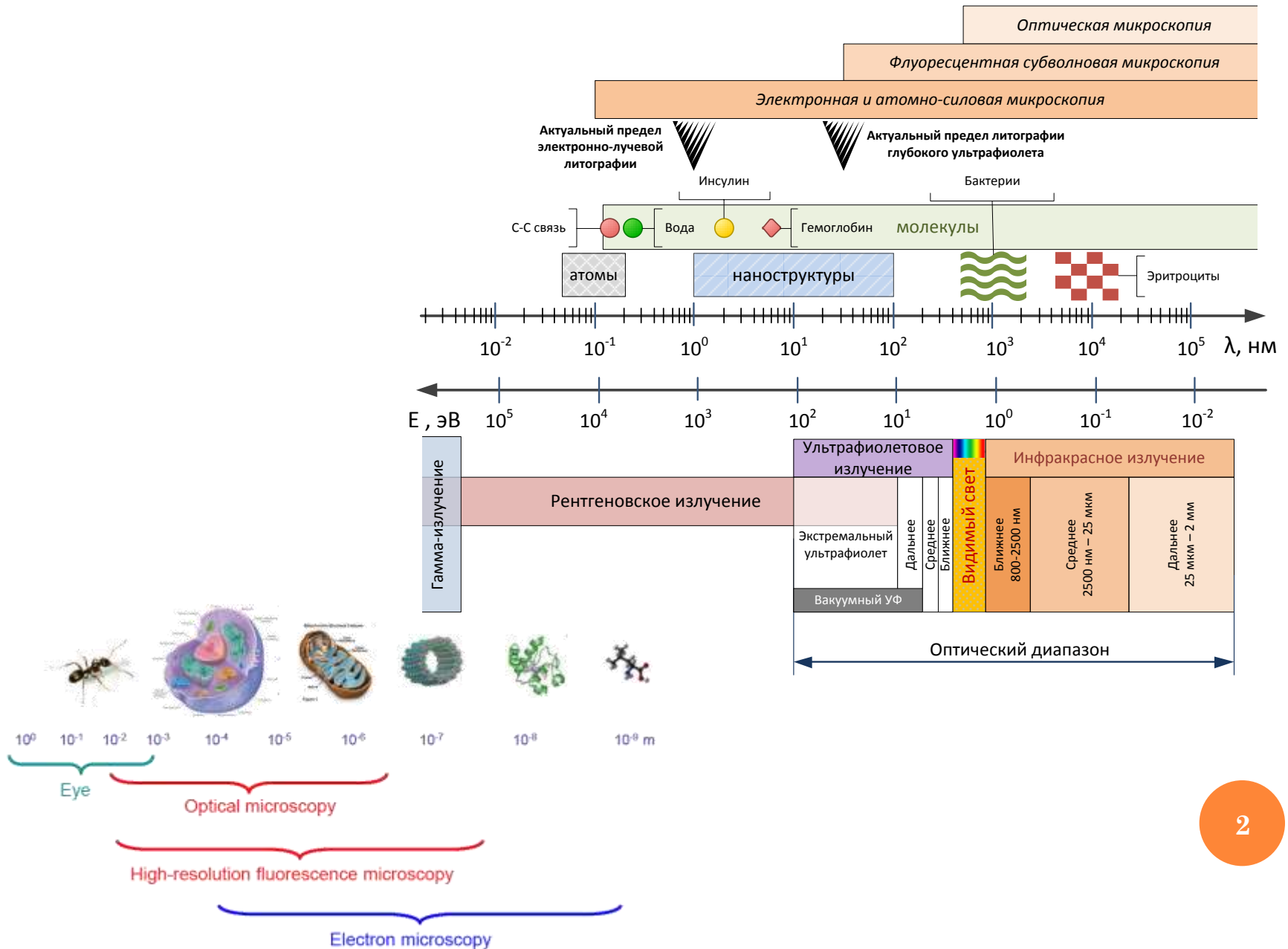


НАНОФОТОНИКА NANOPHOTONICS

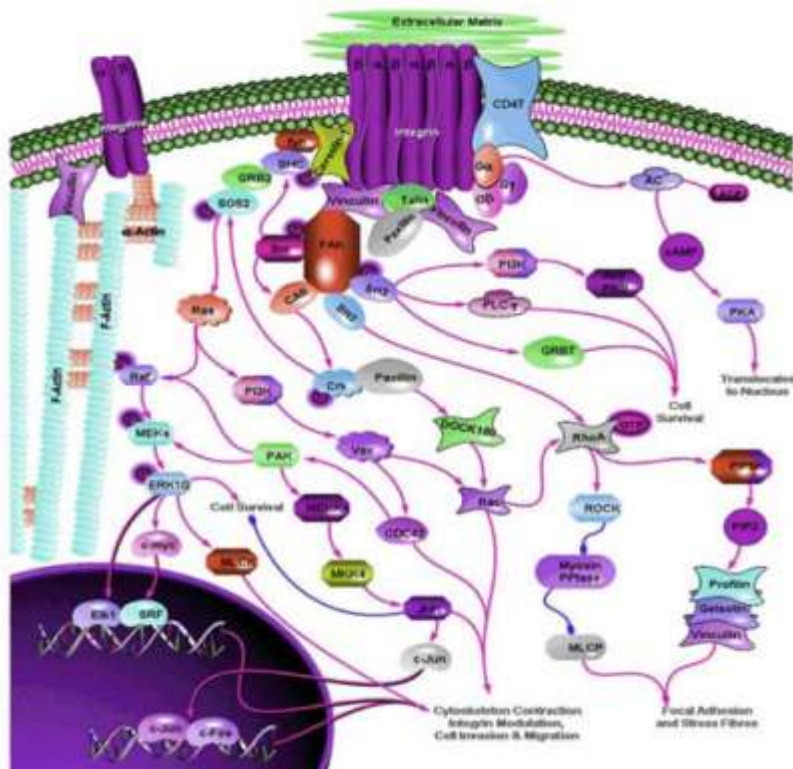
4-5.

Оптическая наноскопия.

ВИДИМОЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ



ПОЧЕМУ ВАЖНА ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ?



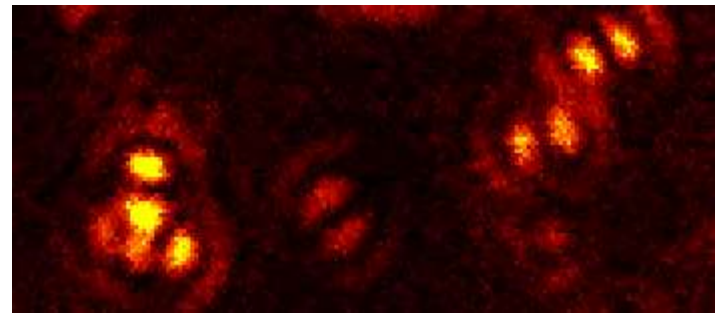
A description in terms of both **space and time** is necessary to understand cellular function

- Synthesis of biomolecules
- Modification of biomolecules
- Interactions between biomolecules
- Transport of molecular components
- Cell Signaling
- Gene Activation
-



Monitoring of sub-cellular dynamics requires observation of **live cells**.

ДИФРАКЦИОННЫЙ ПРЕДЕЛ



В случае некогерентного света, падающего на объект, наименьшее линейное расстояние, которое может разрешить оптическая система, определяется соотношением

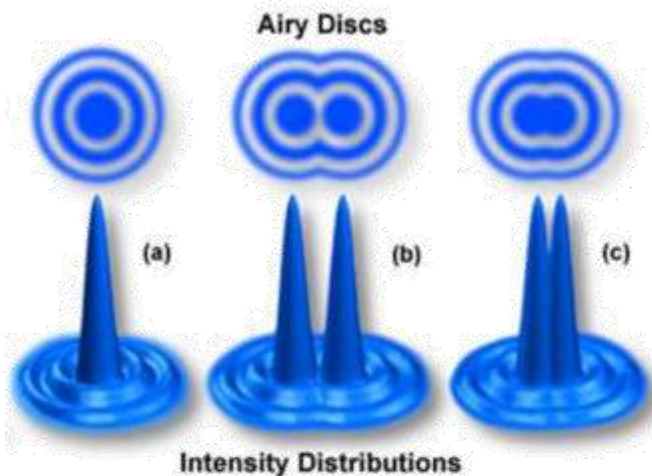
$$d_{min} = \frac{\lambda}{2NA}$$

1873 год, Э. Аббе

Числовая апертура $NA = n \cdot \sin(u / 2)$, где u – угловая апертура объектива микроскопа, т. е. угол между крайними лучами конического светового пучка на входе оптической системы.

Этим определяется ограничение на минимальный размер объекта, который можно уверенно разрешить с помощью оптического микроскопа.

ОПТИЧЕСКОЕ РАЗРЕШЕНИЕ



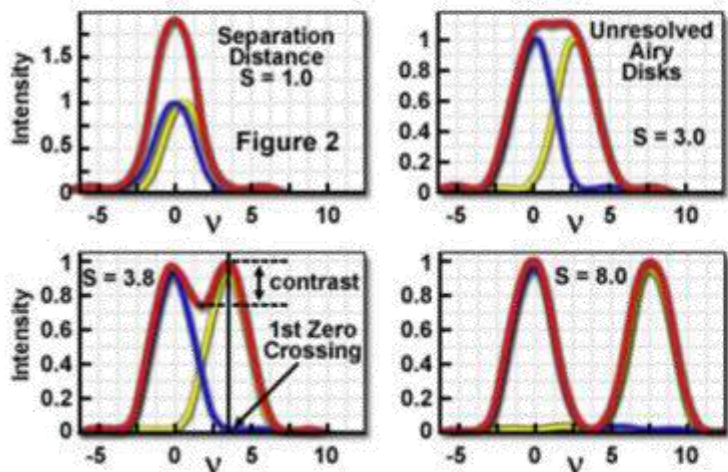
For independent, incoherent sources:

- **Rayleigh criterion:** spacing = radius.

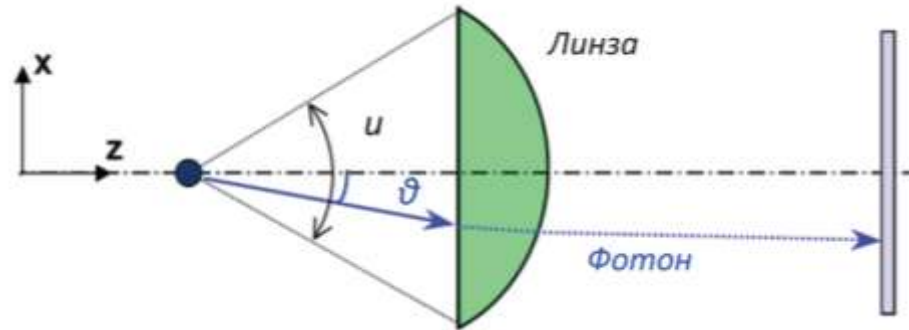
$$d_{\min} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

- **Sparrow criterion:** contrast = 0 (flat top).

$$d_{\min} = 0.47 \frac{\lambda}{NA}$$



ЕЩЁ ОДИН ВАРИАНТ ОЦЕНКИ ДИФРАКЦИОННОГО ПРЕДЕЛА



$$\Delta x \cdot \Delta p_x \geq h$$

$$|p_x| = p_0 \sin \vartheta \leq p_0 \sin(u/2) \leq p_0$$

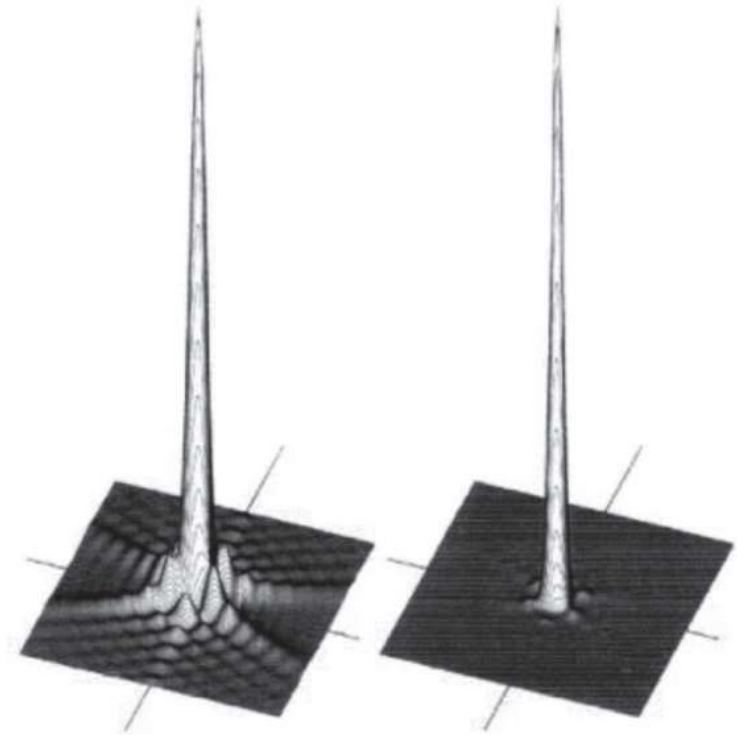
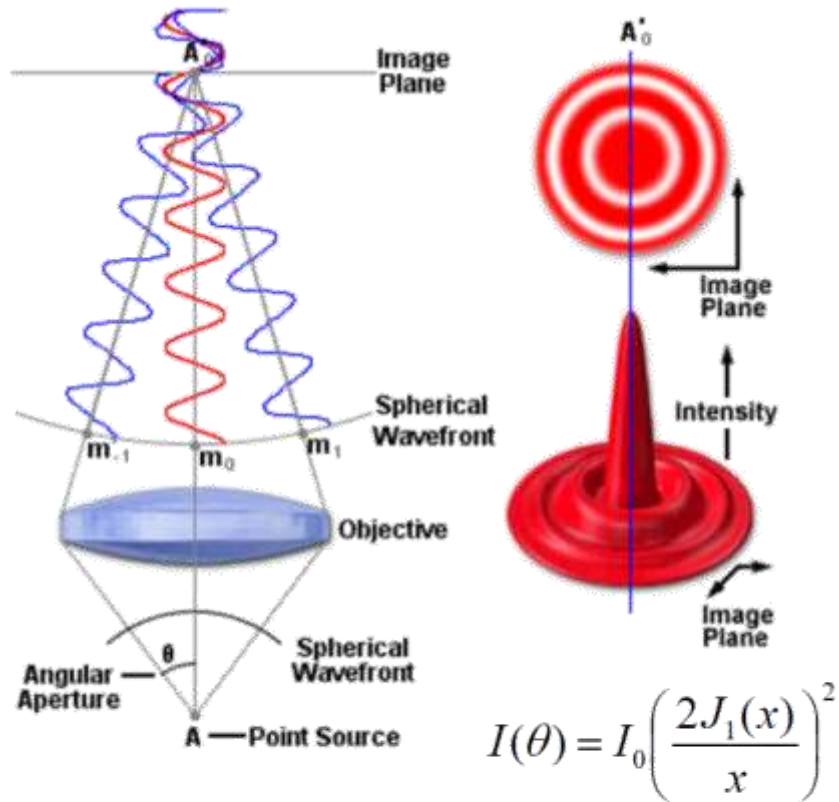
$$p_0 = h / \lambda$$

$$\Delta p_x = 2(h / \lambda) \cdot NA.$$

Можно считать, что для захваченного линзой фотона максимальная неопределённость импульса вдоль оси x в общем случае будет в два раза больше, чем модуль проекции импульса: $\Delta p_x = 2p_0 \sin(u/2)$.

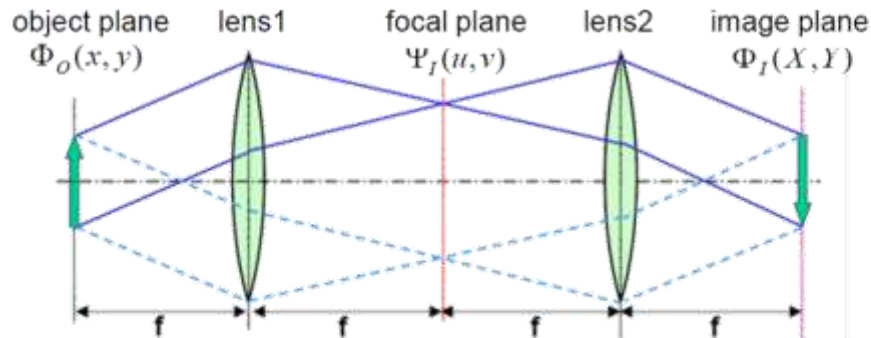
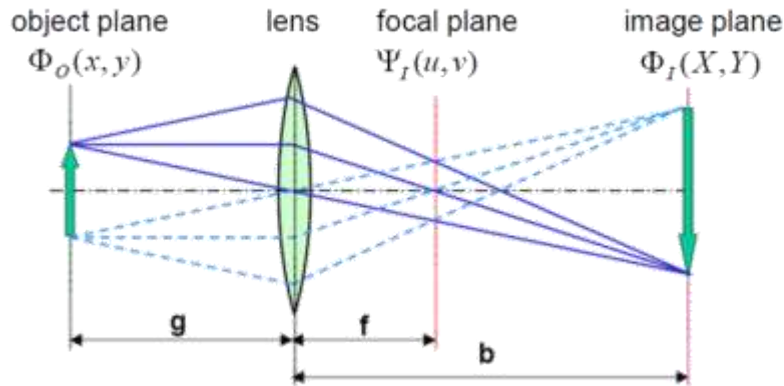
$$\Delta x \geq \frac{\lambda}{2NA}$$

АППАРАТНАЯ ФУНКЦИЯ (ФУНКЦИЯ РАССЕЯНИЯ ТОЧКИ)



The PSF describes the response of an imaging system to a point source.

АППАРАТНАЯ ФУНКЦИЯ (ФУНКЦИЯ РАССЕЯНИЯ ТОЧКИ)



Ideal image formation as two successive Fourier transforms:

$$\Phi_o(x, y) \xrightarrow{FT} \Psi_I(u, v) \xrightarrow{FT} \Phi_I(X, Y)$$

In practice, the Fourier transform is limited to a range of spatial frequencies given by a filter, or **optical transfer function (OTF)**:

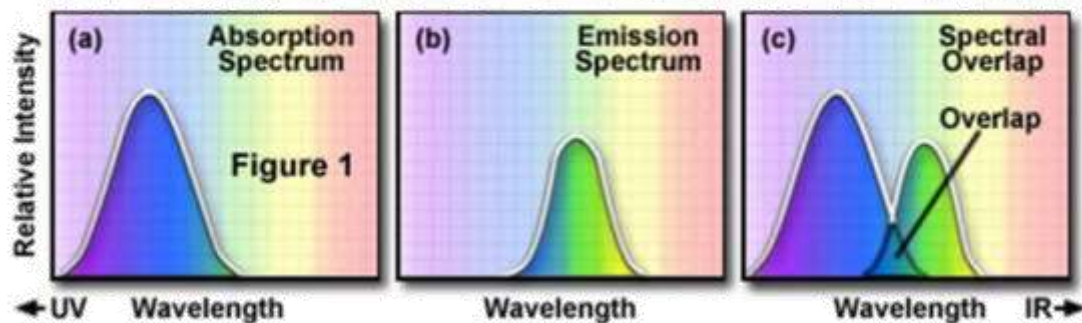
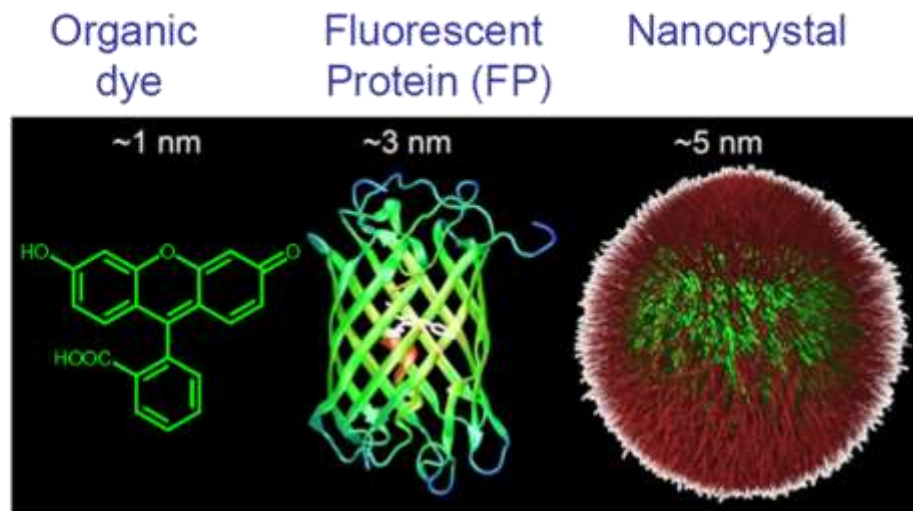
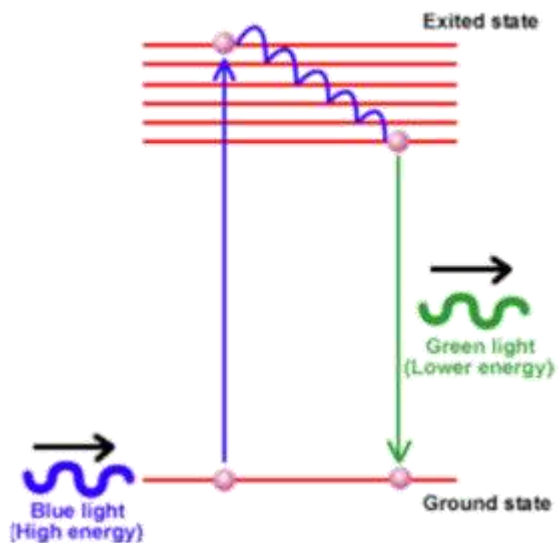
$$\Phi_o(x, y) \xrightarrow{FT, OTF(u, v)} \Psi_I(u, v) \xrightarrow{FT} \Phi_I(X, Y)$$

$$\Psi_I(u, v) = FT[\Phi_o(x, y)] \times OTF(u, v)$$

By applying the convolution theorem, we find that the image is blurred by the **point spread function (PSF)**:

$$\Phi_I(X, Y) = \Phi_o(x, y) \otimes PSF(x, y)$$

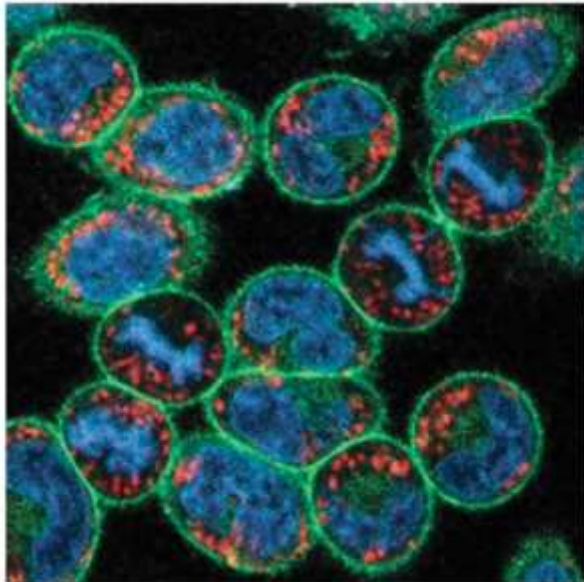
ФЛУОРОФОРЫ



Stokes shift

PROTEINS...

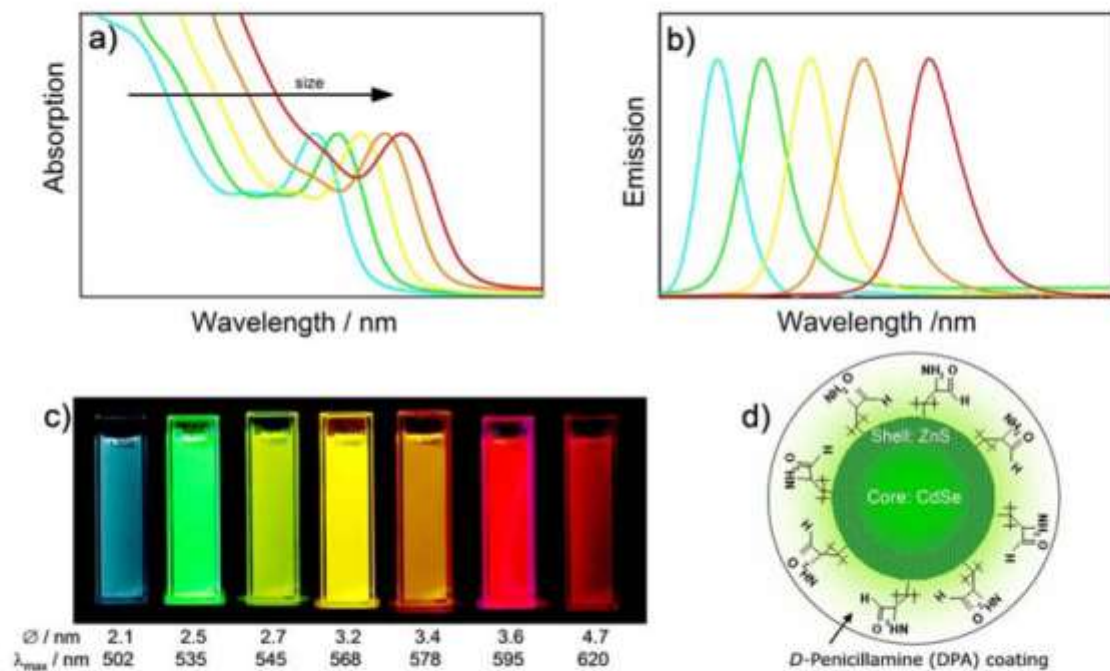
GFP — белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который люминесцирует в зелёном диапазоне (max 509 нм) при освещении его синим светом. В настоящее время ген белка широко используется в качестве светящейся метки в клеточной и молекулярной биологии (размер ~ 3 нм). В 2008 году О. Симомура, М. Чалфи и Р. Тсьен получили Нобелевскую премию по химии «за открытие и разработку зелёного флуоресцентного белка GFP».



В наноптике этот белок и его производные (хромофоры с различными цветами люминесценции) используются в субволновой флуоресцентной спектроскопии с разрешением до **10 нм**

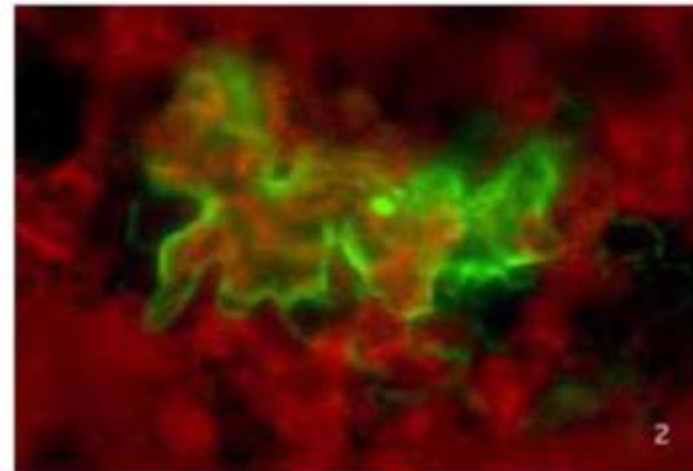
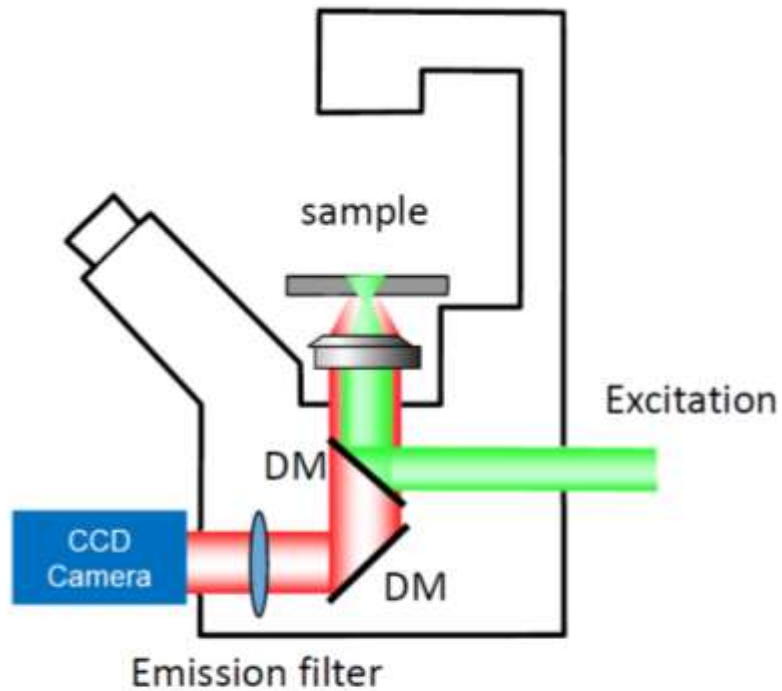
...ИЛИ КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ

Luminescent Nanocrystals – CdSe-ZnS Quantum Dots



Semiconductor nanocrystals and metal nanoclusters exhibit bright luminescence and high photostability.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ ШИРОКОГО ПОЛЯ



<http://www.brc.cornell.edu>

Widefield fluorescence image of a plant leaf
green: epidermal cell GFP marker
red: chlorophyll autofluorescence in lower cell layers.

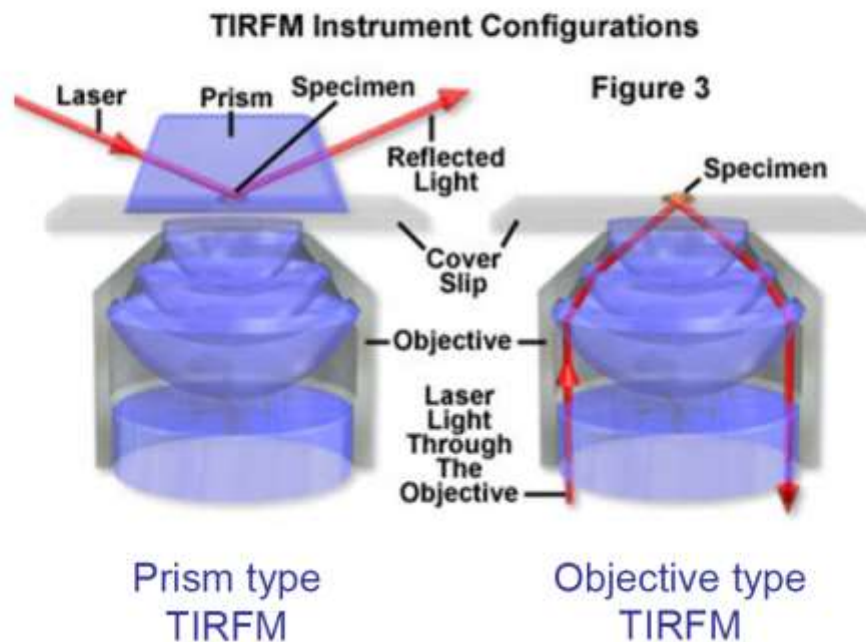
Problems:

- No depth discrimination, all sample layers contribute to the image
- The entire sample is exposed to excitation light; blur due to scattering

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ

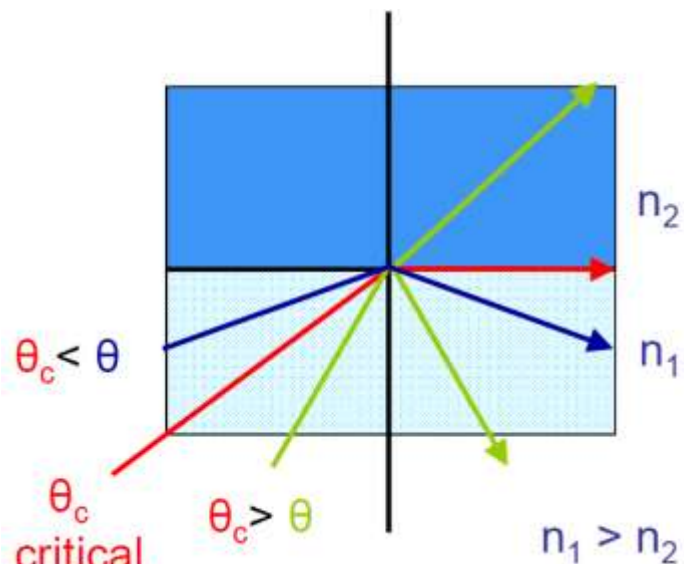
Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy

Two different realizations:



Интенсивность излучения, проникающего во вторую среду затухает по экспоненциальному закону, что позволяет детектировать флуоресцентные объекты, возбуждаемые этим излучением, в пограничном слое толщиной ~100 нм с разрешением до 10 нм

ПРИНЦИП TIRF МИКРОСКОПИИ

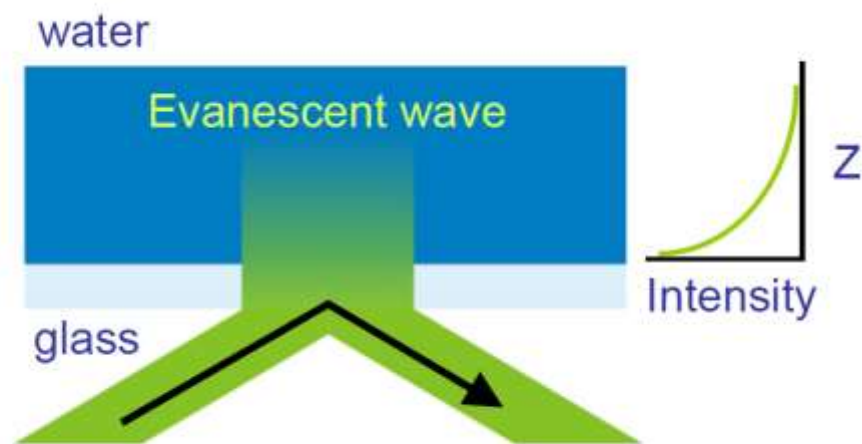


θ_c
critical
angle

Snell's law of refraction:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

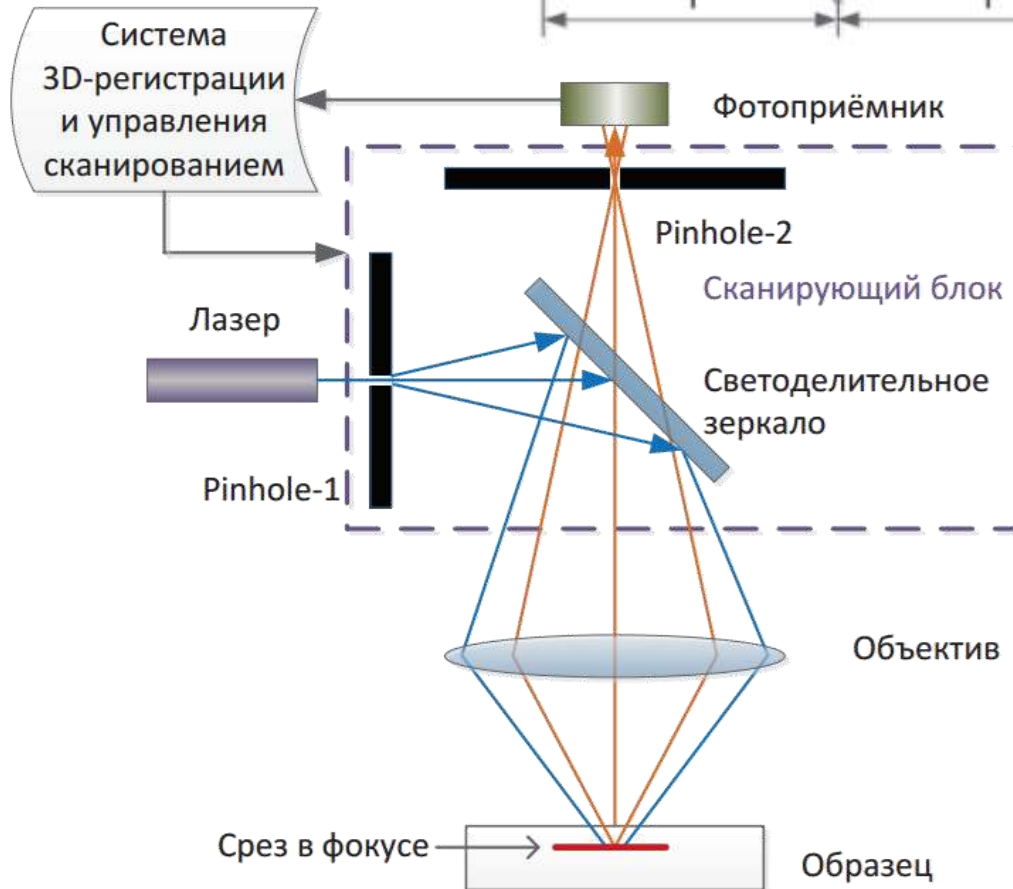
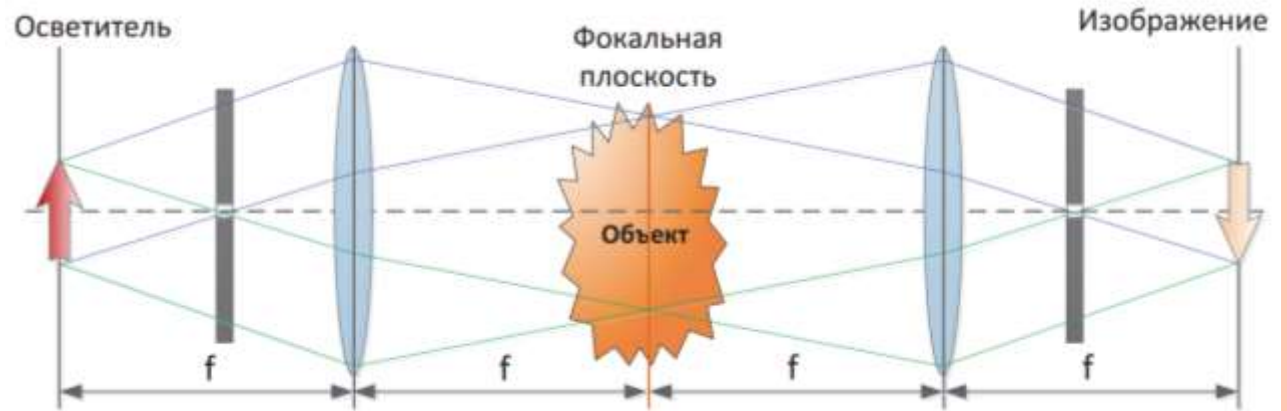
$$\text{for } \theta_1 = \theta_c : \sin \theta_2 = 1 \Rightarrow \sin \theta_c = \frac{n_2}{n_1}$$



$$I(z) = I_0 e^{-z/d}$$

Penetration depth of evanescent wave: ~ 100 nm.

КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

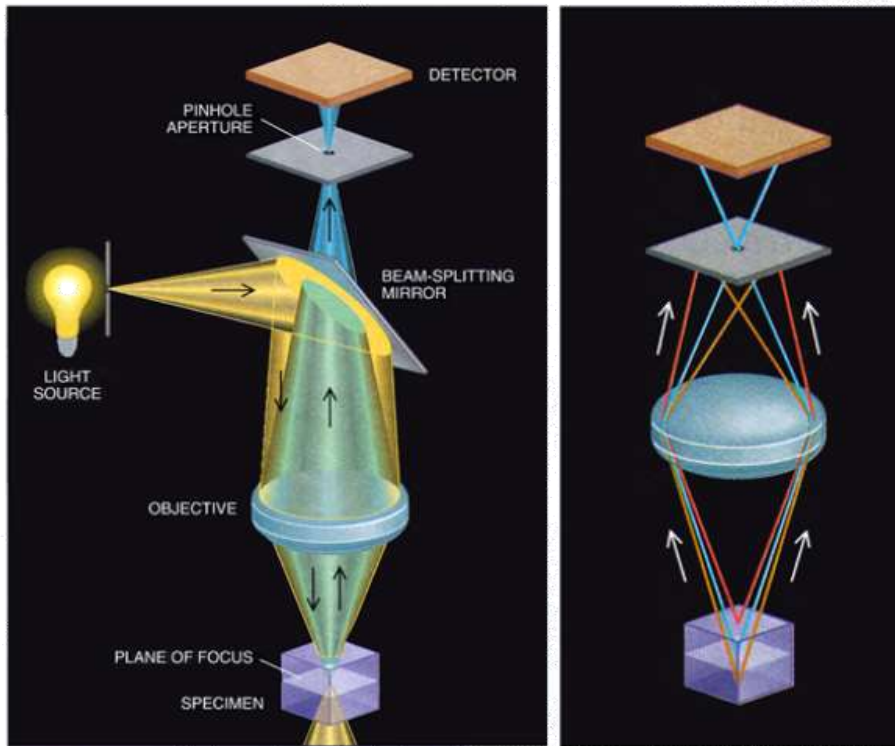


КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Confocal Microscopy Principle

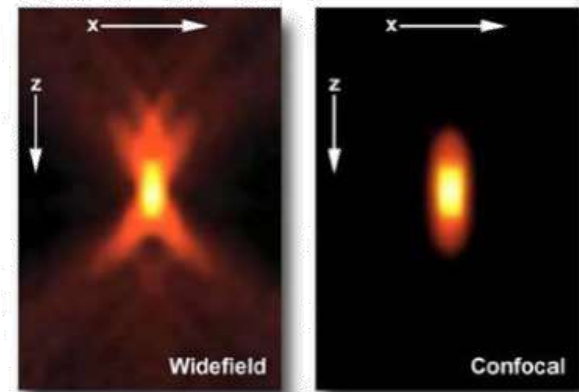


Marvin Lee Minsky
(1927-Present)



J. F. Lichtman, Sci. Am. (August 1994) 30-35.

3-D PSF



typical parameters:

$$w_r \sim 0.25 \mu\text{m}$$
$$w_z = \sim 0.8 \mu\text{m}$$

ПРИМЕРЫ ИЗОБРАЖЕНИЙ

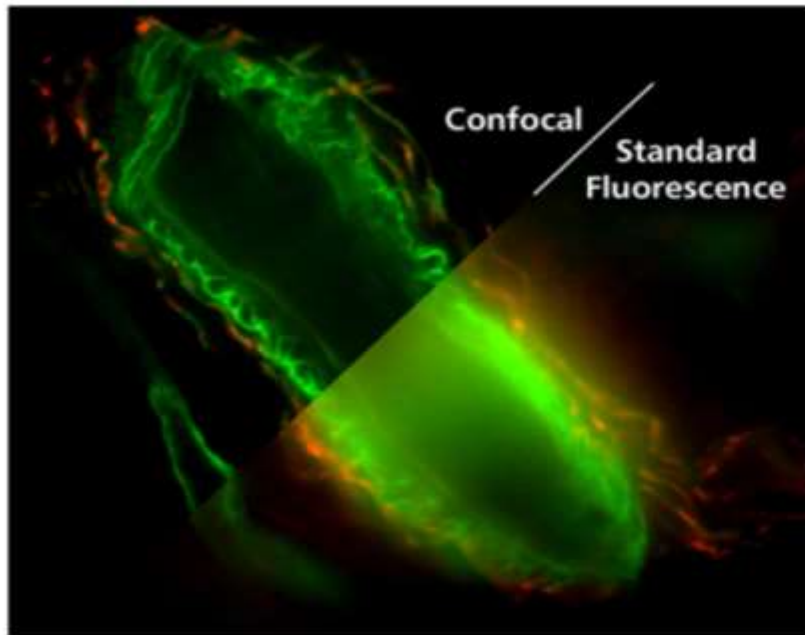
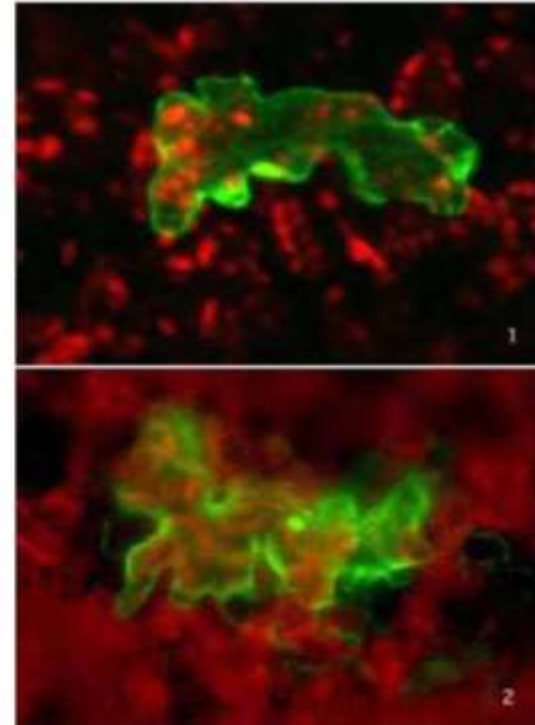


Image acquisition by

- beam steering (fast)
- sample stage scanning (slow)



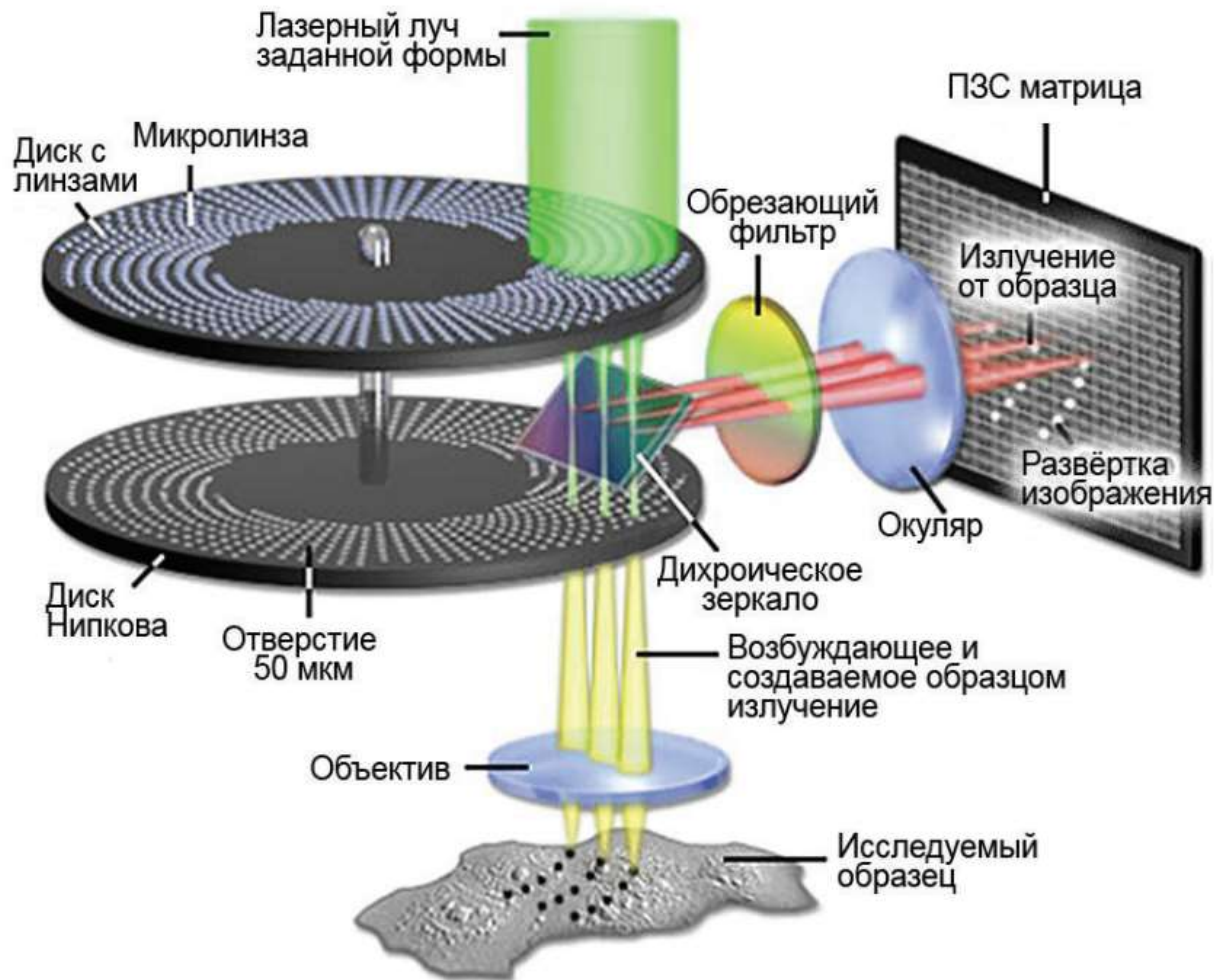
confocal

widefield

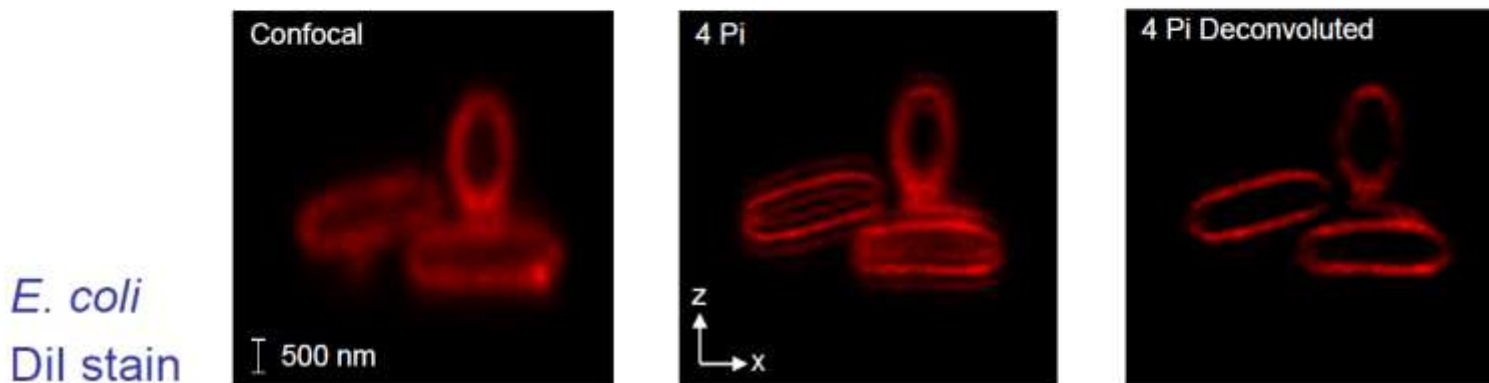
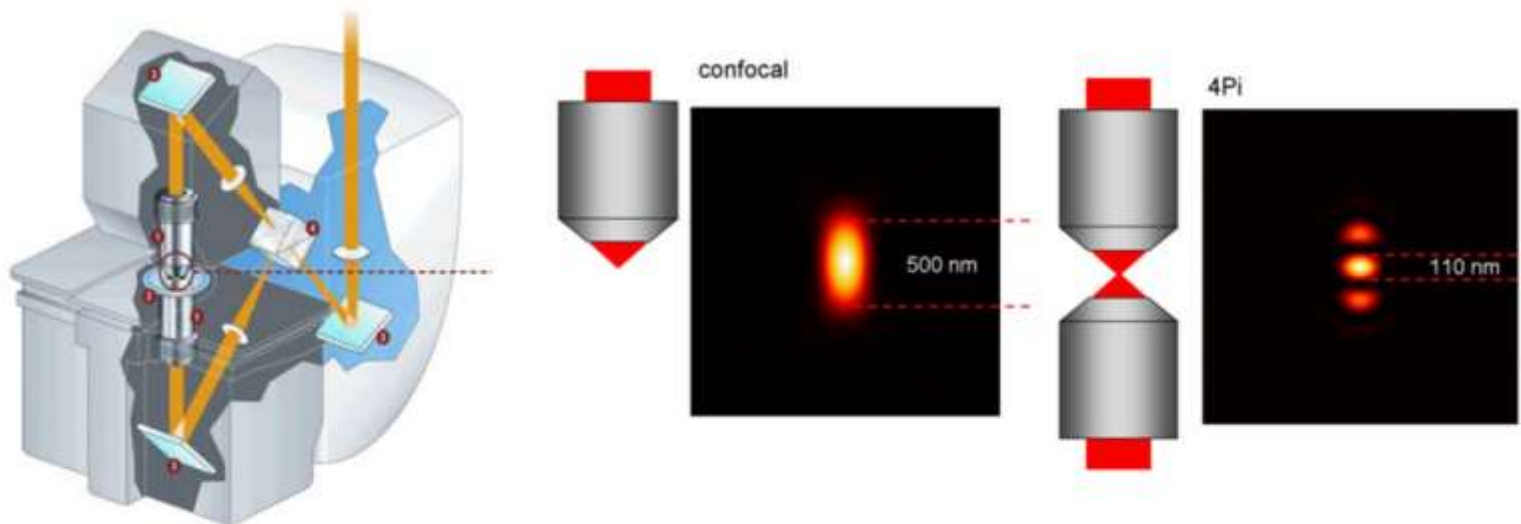
www.brc.cornell.edu

green: epidermal cell GFP marker
red: autofluorescence of the chlorophyll
in the chloroplasts in lower cell layers.

КОНФОКАЛЬНАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ С ДИСКОМ НИПКОВА



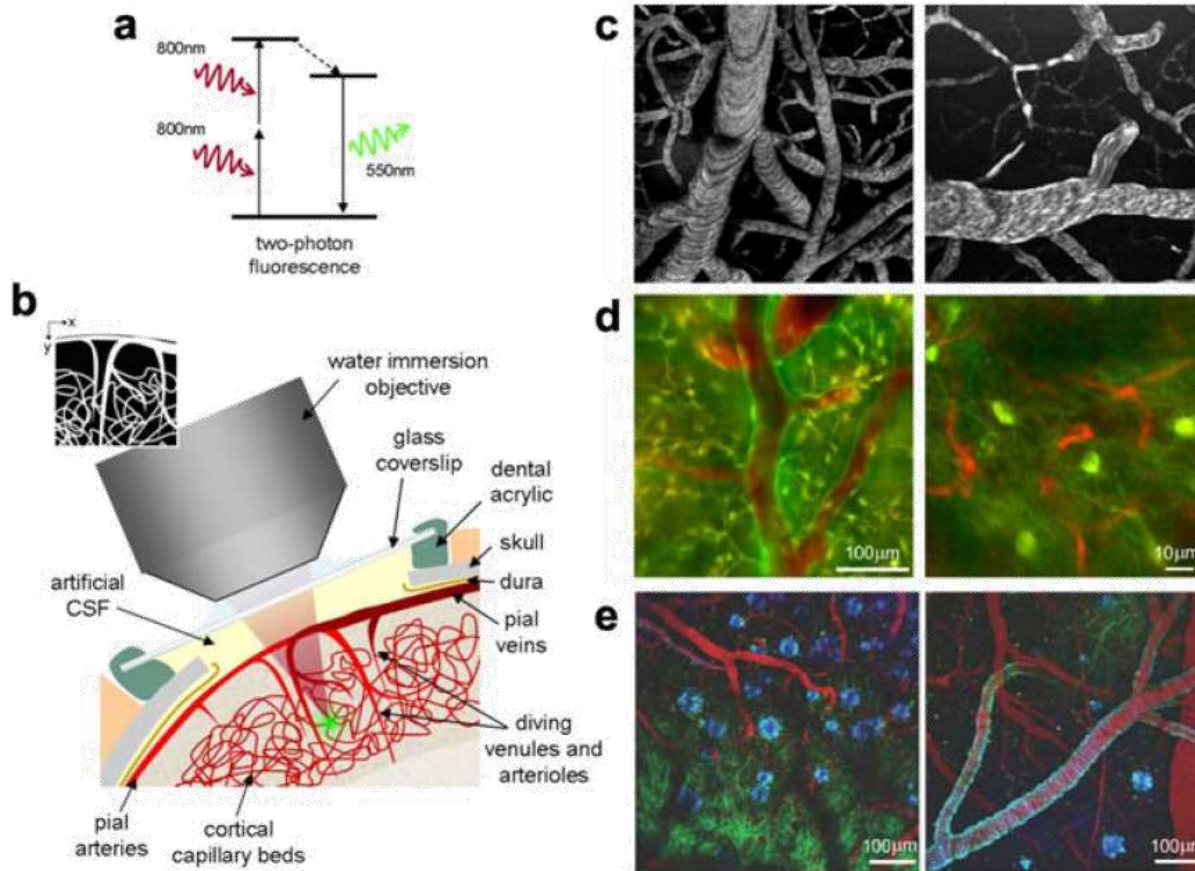
4- Π КОНФОКАЛЬНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МИКРОСКОП



4 π реализован на основе двухобъективной системы, которая позволяет улучшить разрешение вдоль оптической оси благодаря суммированию в фокальной точке двух встречных сферических фронтов света.

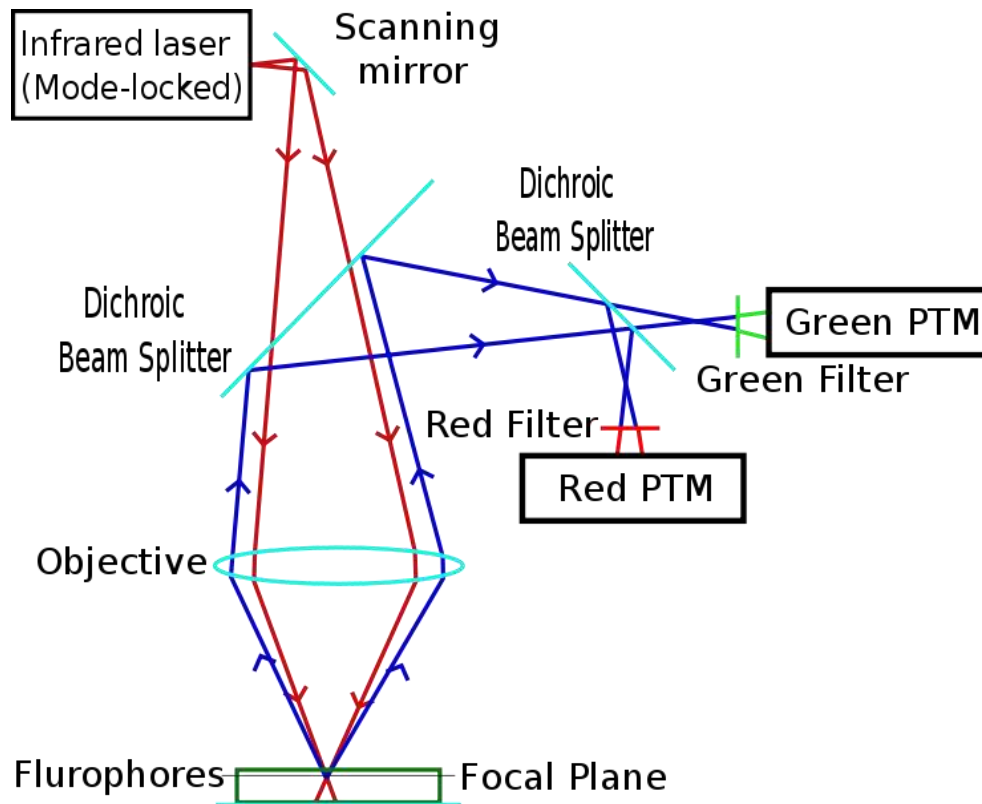
ДВУХФОТОННЫЙ ЛАЗЕРНЫЙ МИКРОСКОП

2-Photon Microscopy in Brain Tissue Imaging



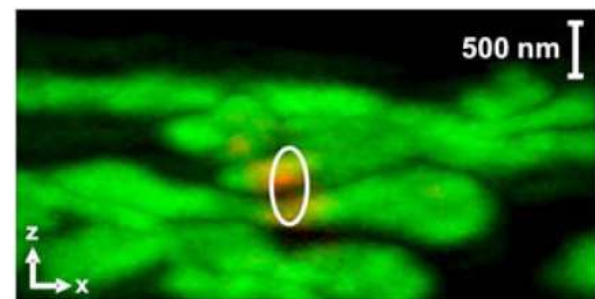
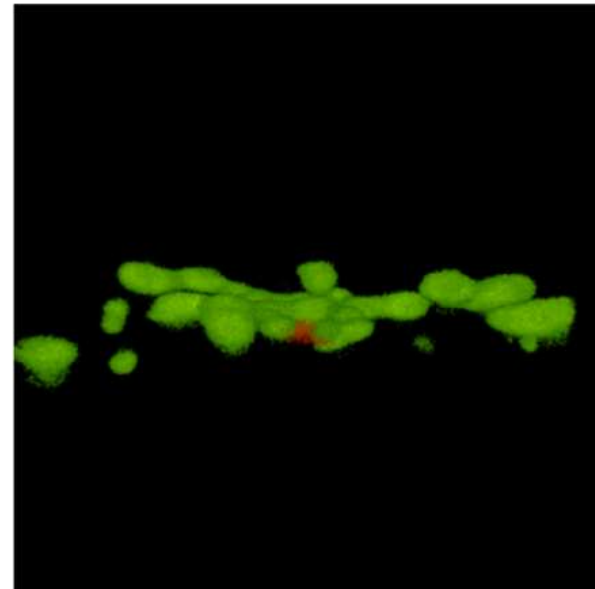
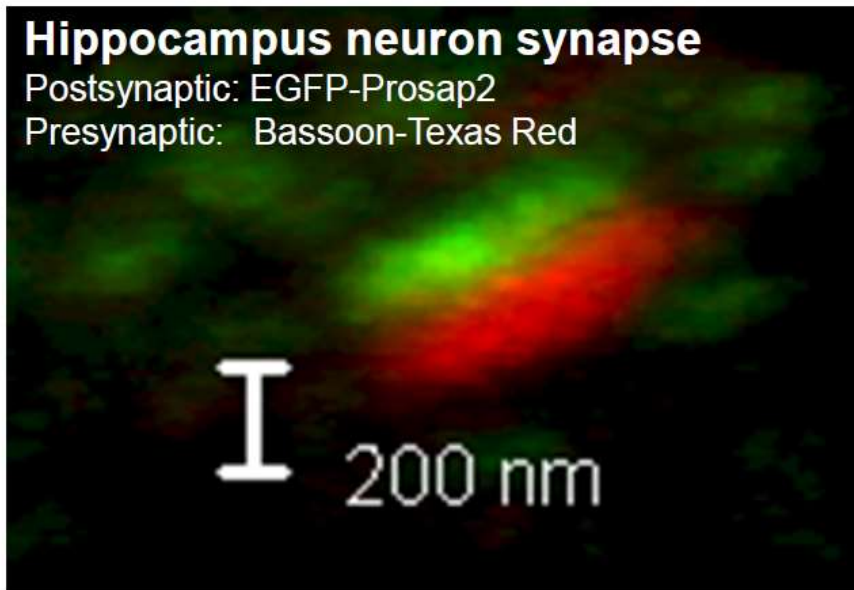
Two-photon microscopy of *in vivo* brain function. (a) Basic mechanism of two-photon fluorescence. (b) Schematic of surgical preparation of exposed cortex, with sealed glass window and microscope objective positioning. Green dot shows location of two-photon fluorescence. (c) Two-photon map of the vasculature following intravenous injection of dextran-conjugated fluorescein. Black dots and stripes show red blood cell motion. (d) Dual-channel imaging of neuronal (green) and vascular (red) signals: Oregon Green 488 BAPTA-1 AM calcium sensitive dye stained neurons, Texas dextran red is the intravascular tracer. (e) Three channel imaging of Tg2576 APP Alzheimer's disease mouse model with amyloid-targeting dye (blue), GFP expressing neurons and dendrites (green) and vasculature (red).

ПРИНЦИП ДВУХФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ



Два фотона, обладающие низкой энергией, возбуждают флюорофор в течение одного квантового события. Результатом является последующее испускание возбужденными молекулами флюоресцентного фотона, энергия которого больше энергии возбуждающих фотонов. Вероятность того, что оба фотона возбуждения будут поглощены одной молекулой, очень мала. Поэтому необходимо мощное импульсное возбуждение. Для того чтобы получить двухмерное пиксельное изображение, производится сканирование в фокальной плоскости образца.

ИЗОБРАЖЕНИЯ, ПОЛУЧЕННЫЕ ДВУХФОТОННЫМ 4-ПИ МИКРОСКОПОМ

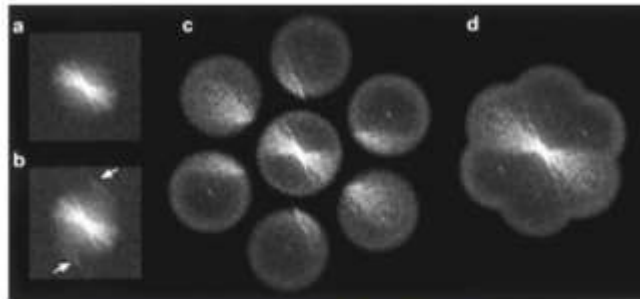


HeLa cell transfected with mt-EosFP
Two-photon activation @ 810 nm
Two-photon excitation @ 970 nm

Ivanchenko et al., Biophys. J. 92 (2007) 4451.

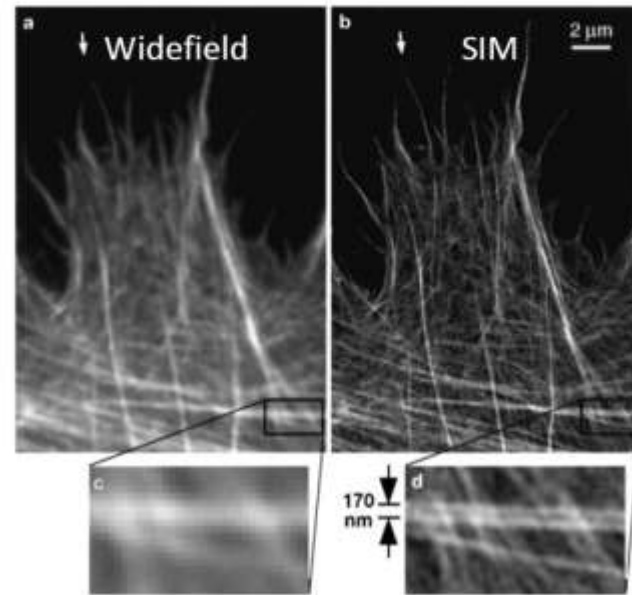
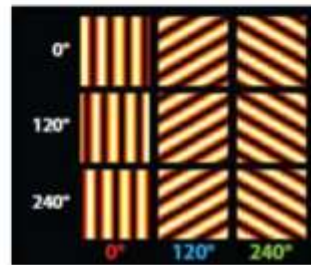
МИКРОСКОПИЯ СТРУКТУРИРОВАННОГО ОСВЕЩЕНИЯ.

Structured Illumination Microscopy (SIM)

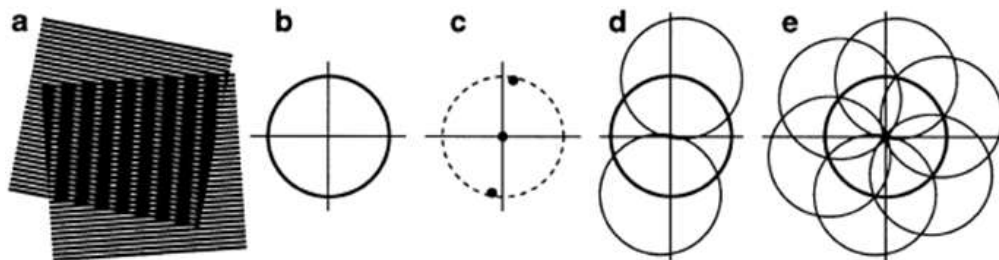


Reciprocal space reconstruction

9 images required:
3 grating translations
3 grating rotations



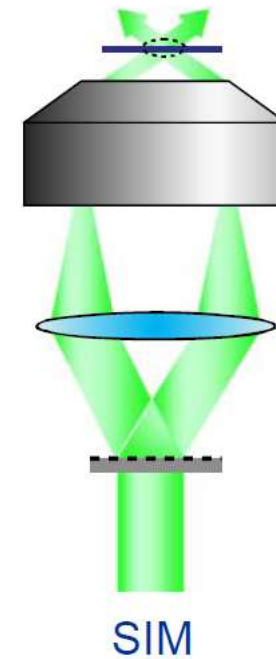
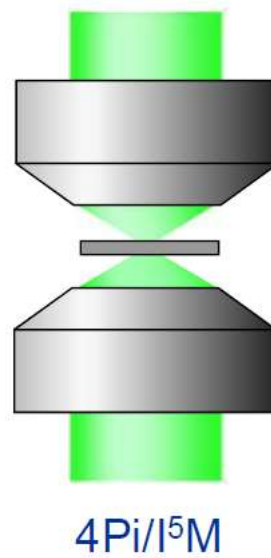
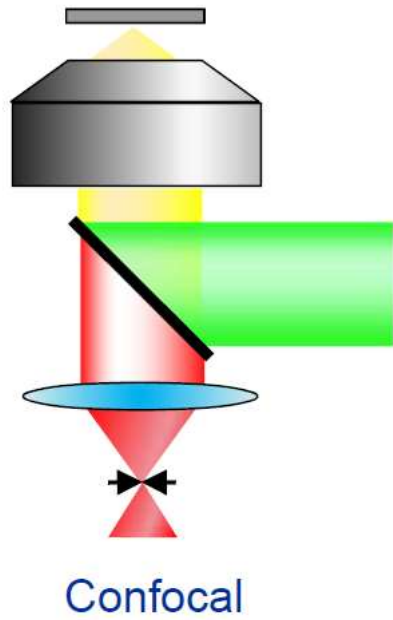
Three-beam interference permits axial sectioning



Эффект муара

И ВСЁ-ЖЕ...

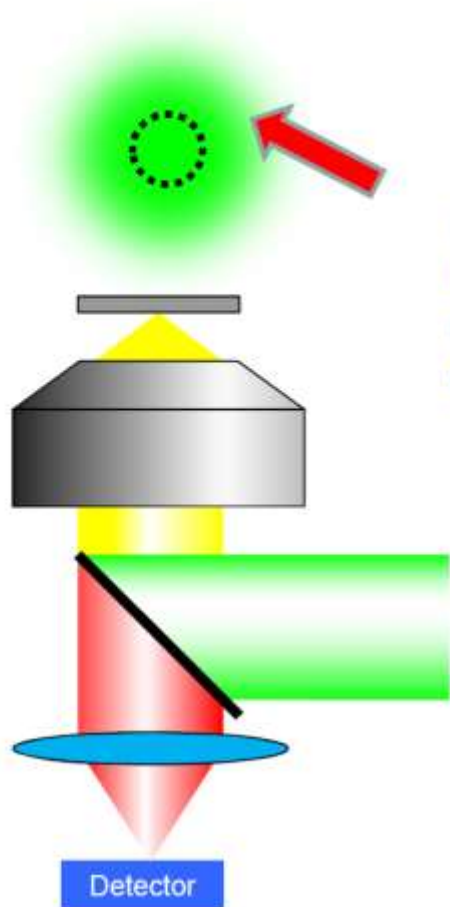
...Still Limited by Diffraction



$$d_{\min} \geq \frac{1}{2} \frac{\lambda}{2NA}$$

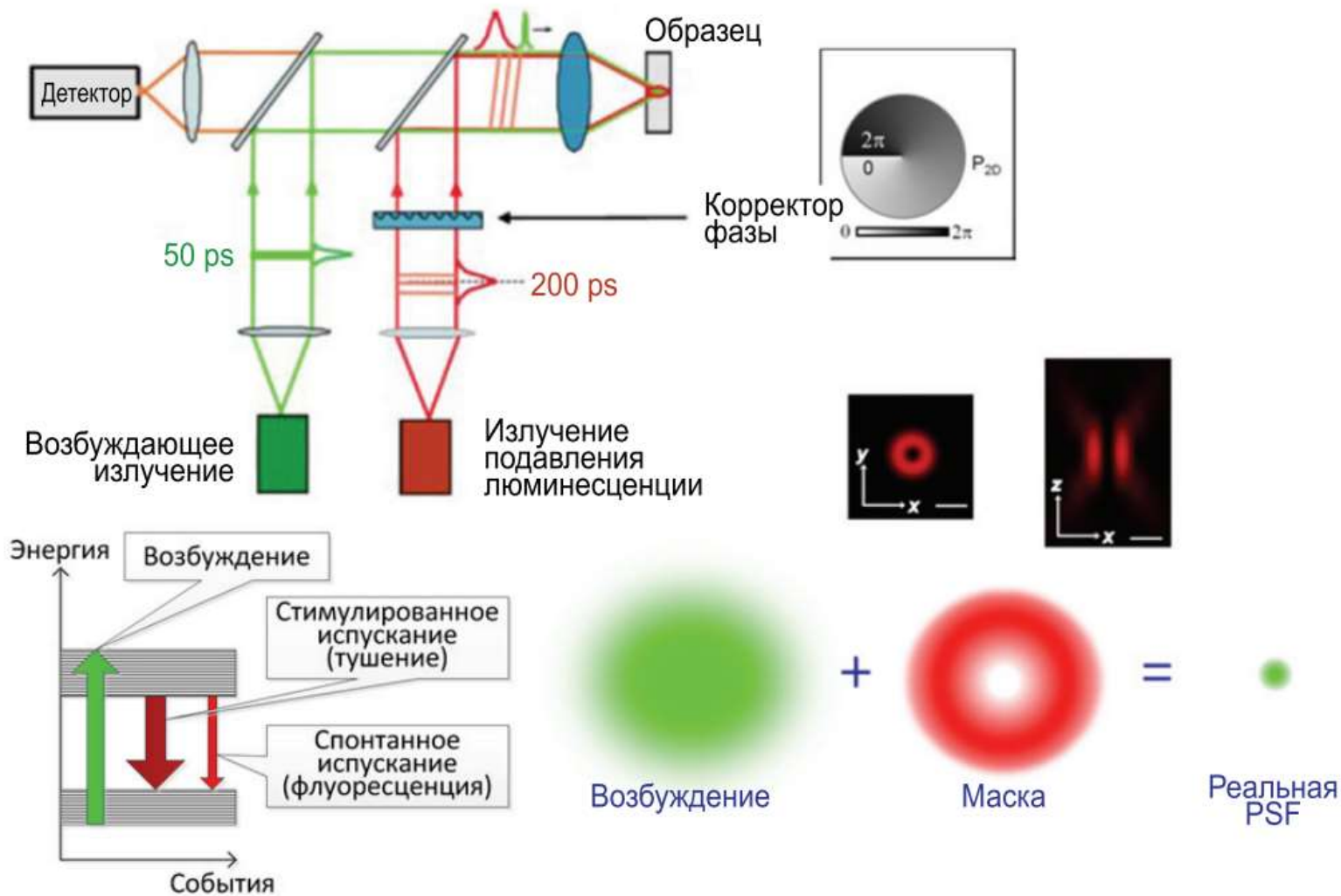
МЕТОД ПОДАВЛЕНИЯ СПОНТАННОГО ИСПУСКАНИЯ В КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy



In a confocal scanning microscope, much higher resolution can be achieved if we can switch off molecules in the periphery of the excitation PSF ("PSF Engineering").

МЕТОД ПОДАВЛЕНИЯ СПОНТАННОГО ИСПУСКАНИЯ В КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ (STED)

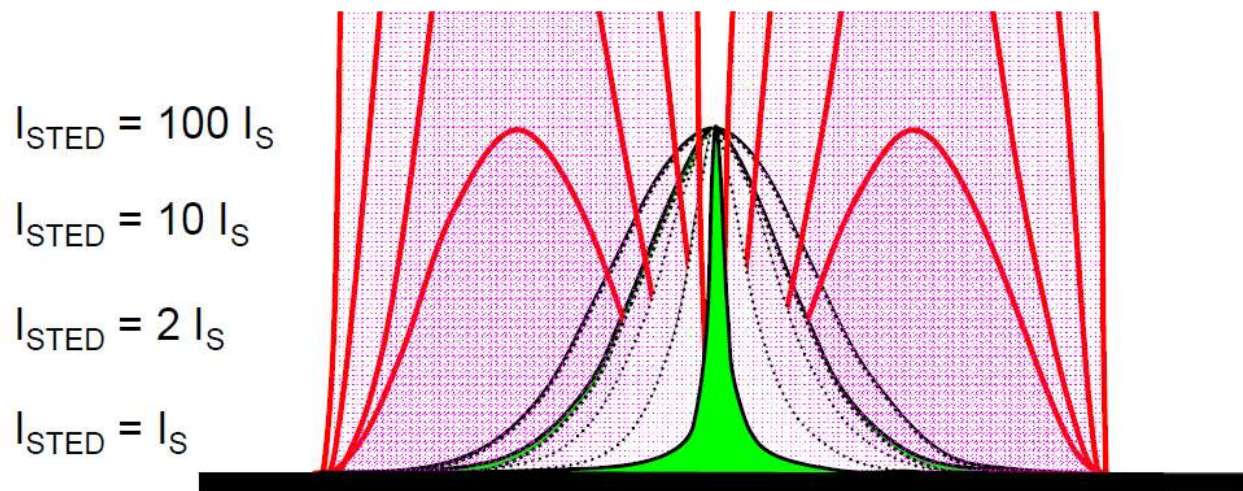


МЕТОД ПОДАВЛЕНИЯ СПОНТАННОГО ИСПУСКАНИЯ В КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ (STED)

Size of the Effective PSF

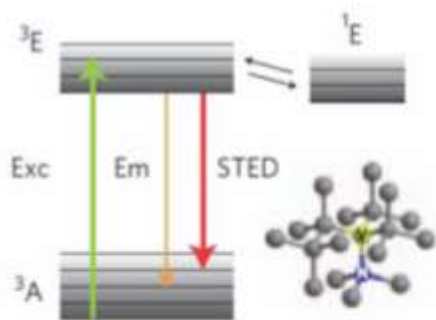
The width of the effective excitation PSF scales with the inverse square root of I_d / I_s .

$$d \approx \frac{1}{\sqrt{1 + I_d / I_s}} \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

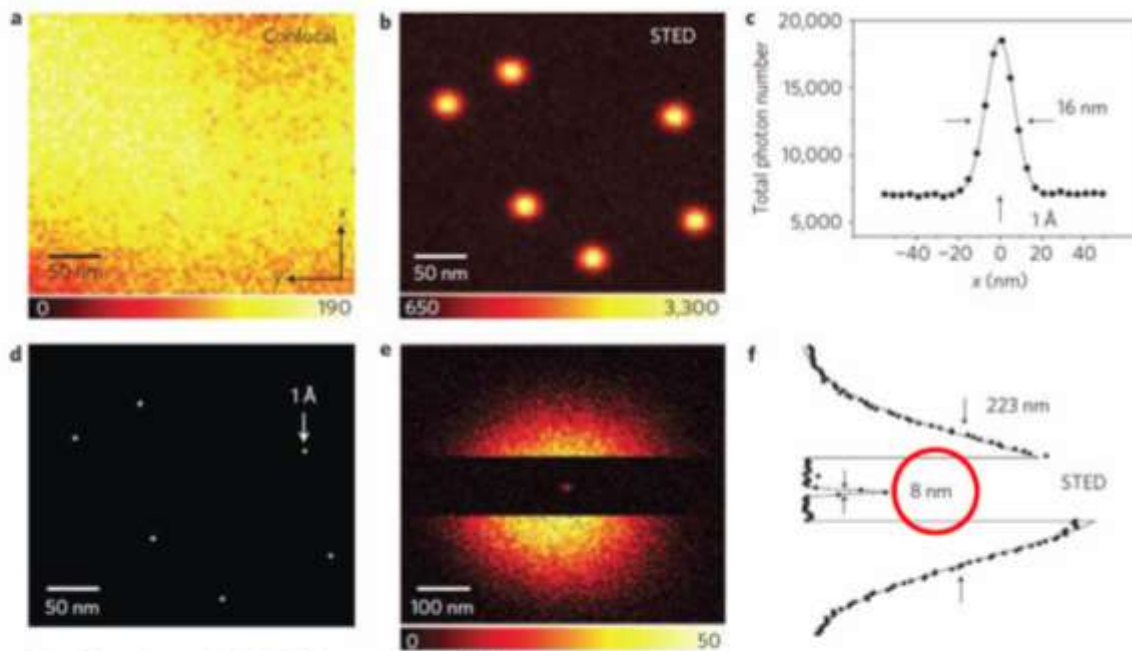


STED: РЕЗУЛЬТАТЫ

STED Image of Color Centers with 8 nm Resolution



Energy diagram of nitrogen-vacancy (NV) centers in diamond.



Confocal and STED imaging of NV centers.

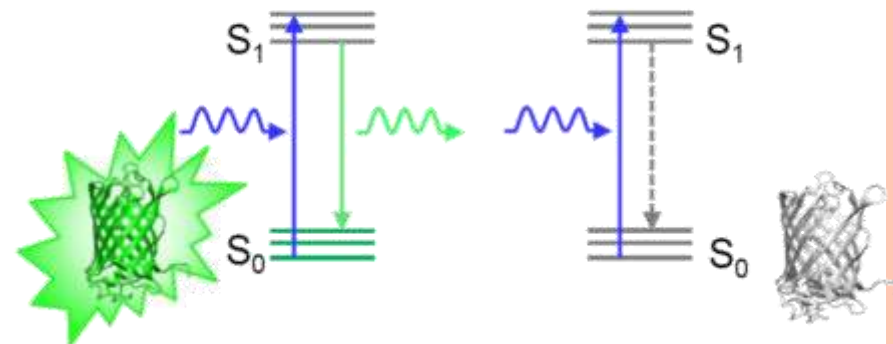
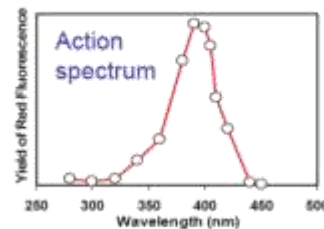
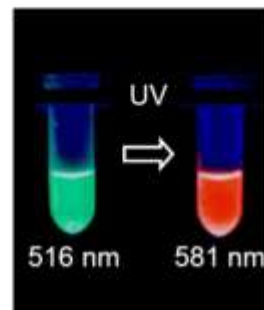
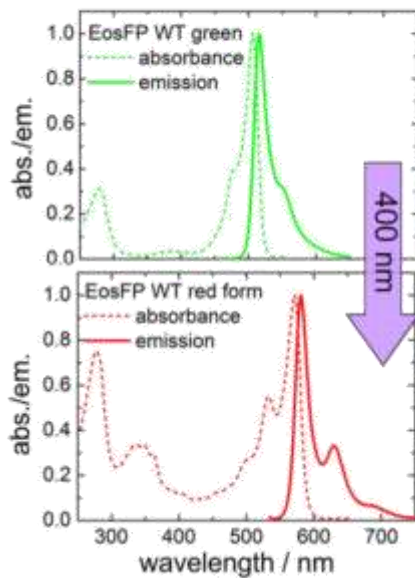
Rittweger et al., Nat. Photonics 3 (2009) 144.

ПРИНЦИПЫ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Photoswitching



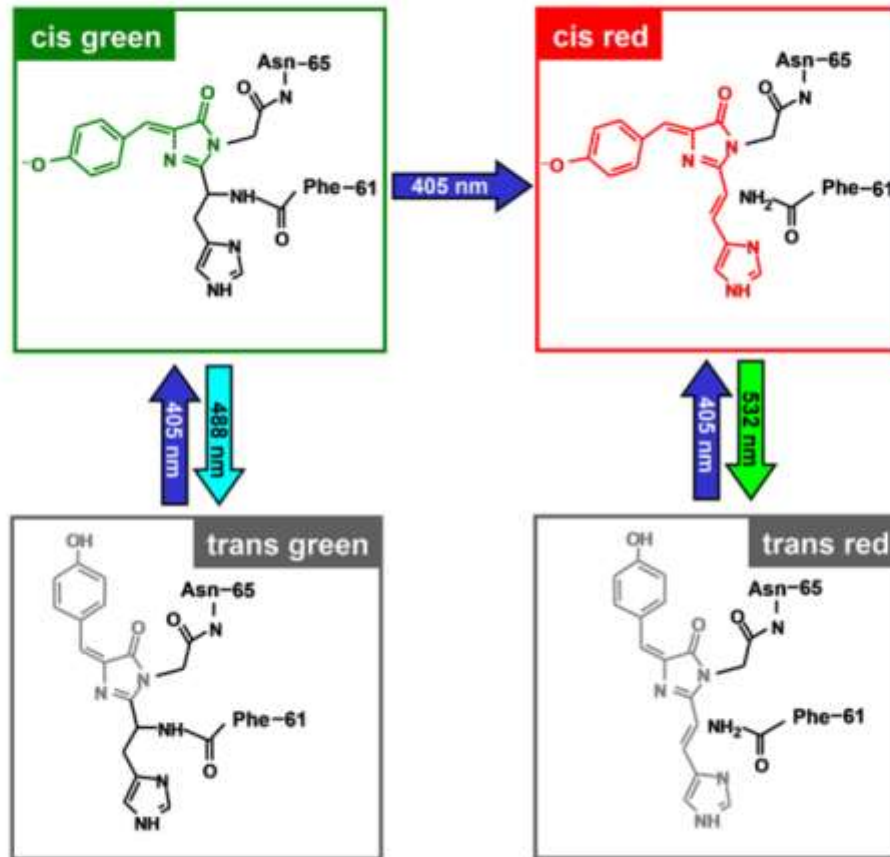
Photoconversion of EosFP with 400-nm Light



Wiedenmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 15905.

ПРИНЦИПЫ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

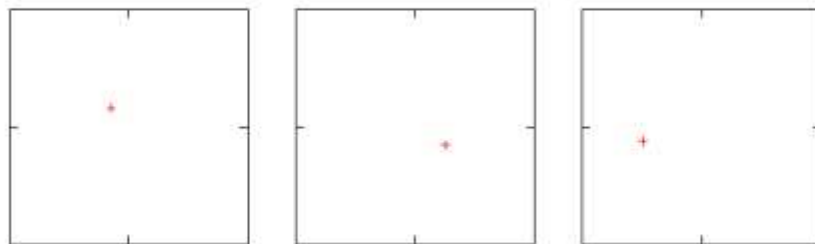
Photoswitching and Photoconversion in IrisFP



Adam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105 (2008) 18343,
Fuchs et al., Nature Methods 7 (2010) 627.

ПРИНЦИПЫ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

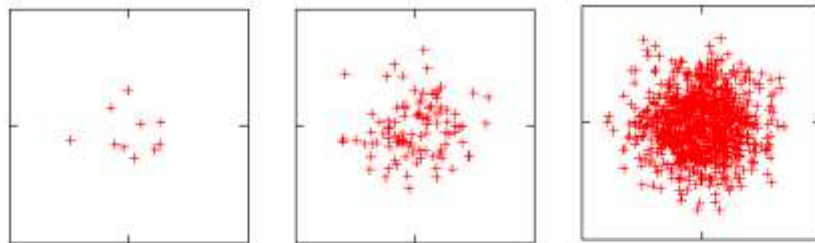
Precision of Single Molecule Localization



1 photon



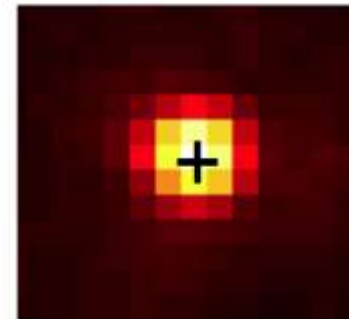
$$d \approx \frac{\lambda}{2NA}$$



10 photons

100 photons

1,000 photons



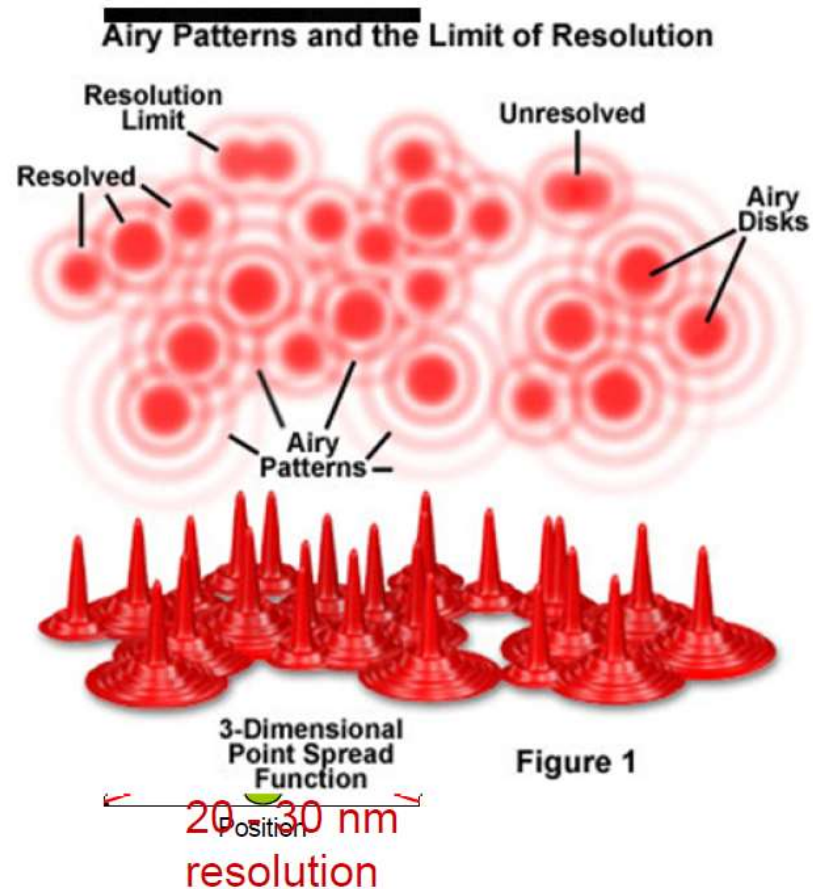
$$d \approx \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{\lambda}{2NA}$$

МИКРОСКОПИЯ ФОТОАКТИВАЦИОННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

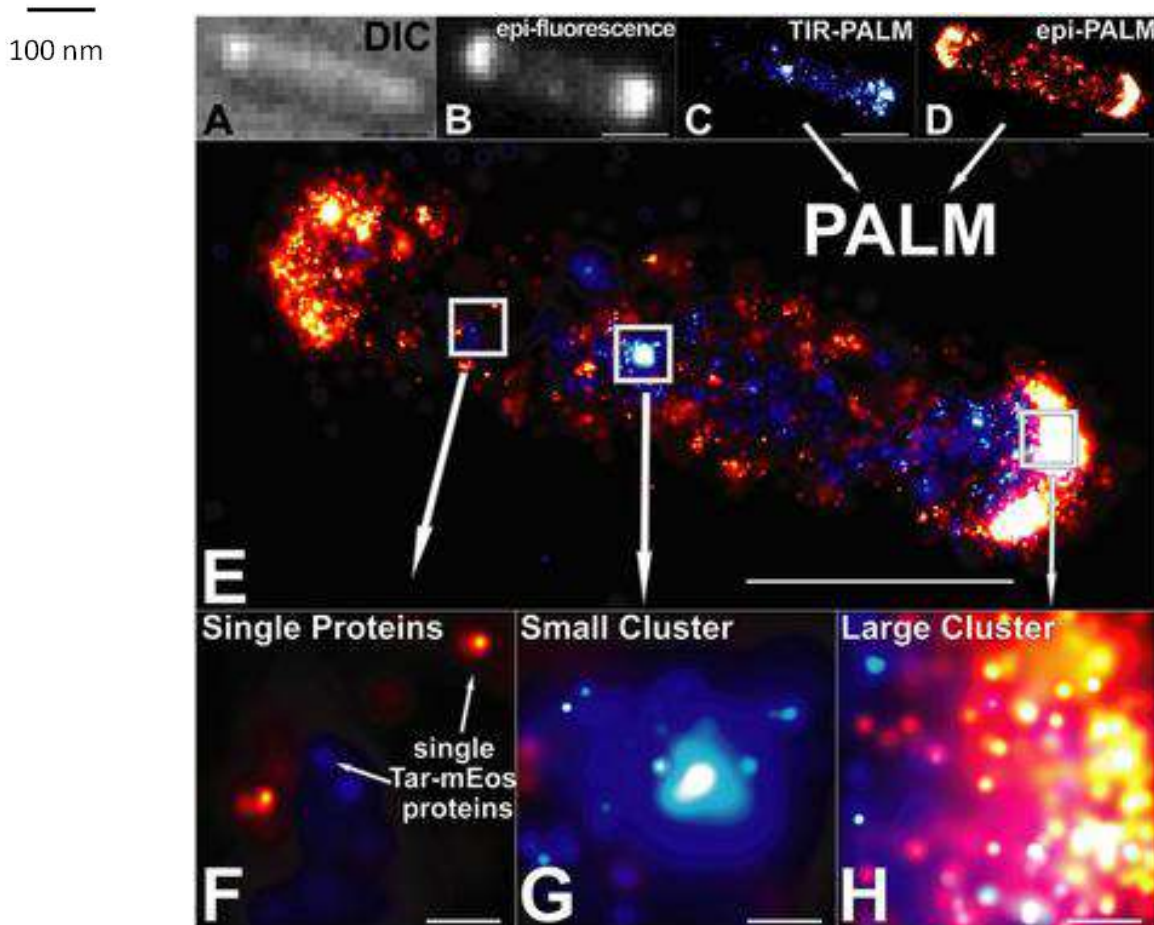
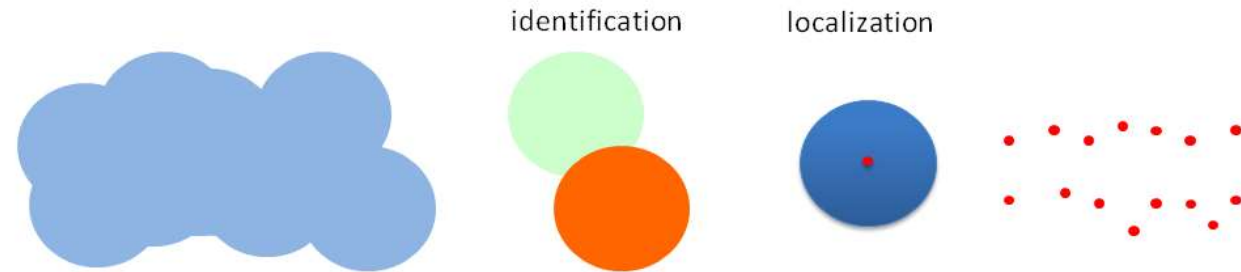
PhotoActivation Localization Microscopy (PALM)



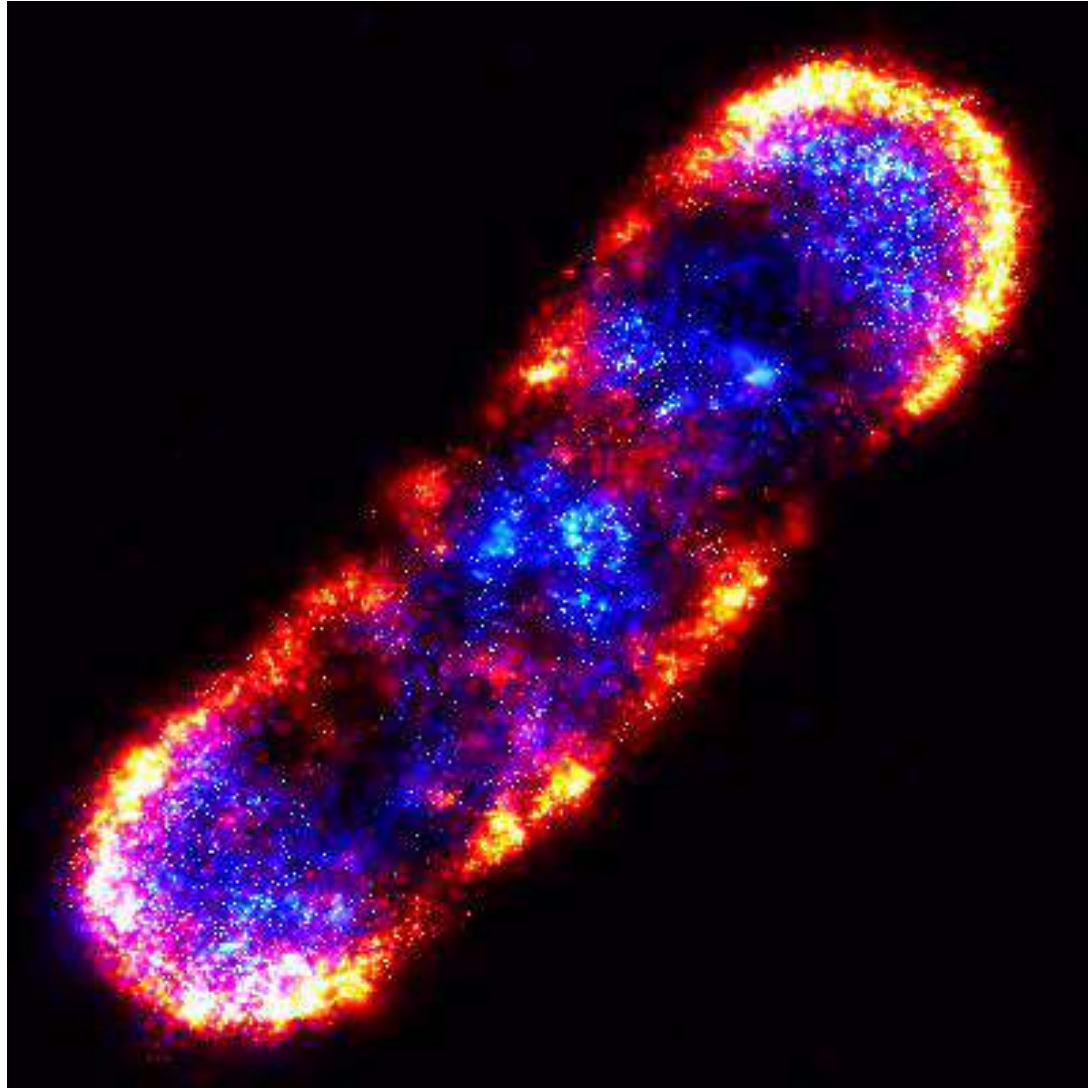
200 - 300 nm
resolution



МИКРОСКОПИЯ ФОТОАКТИВАЦИОННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ (PALM)

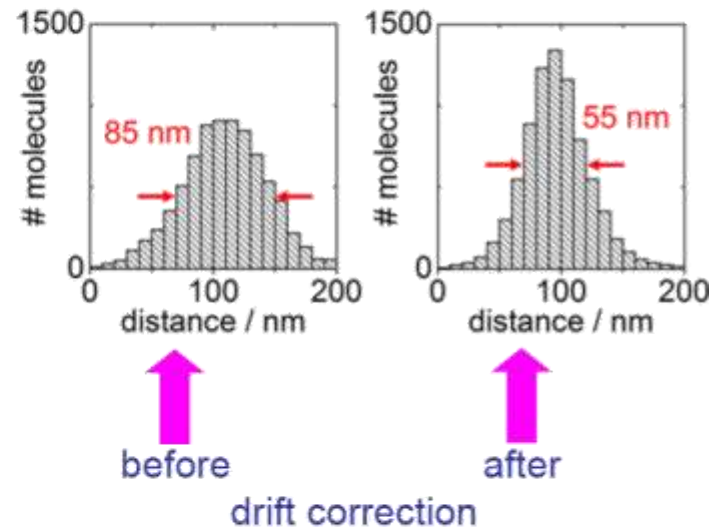
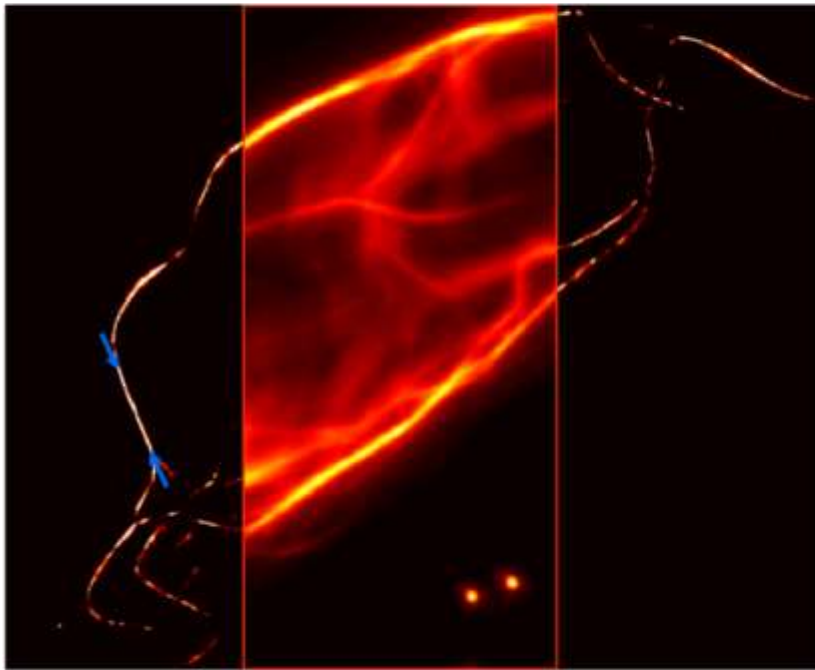


МИКРОСКОПИЯ ФОТОАКТИВАЦИОННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ (PALM)



МИКРОСКОПИЯ ФОТОАКТИВАЦИОННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ (PALM)

Fixed HeLa Cell – PALM Image Using Rita-psRFP



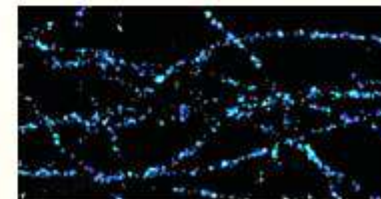
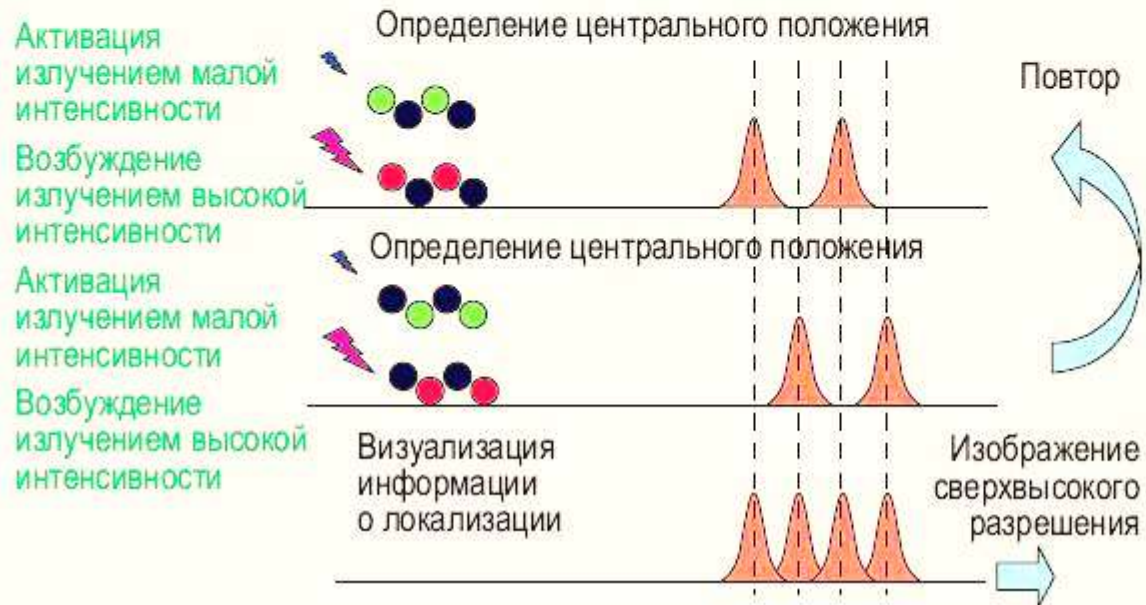
Fluorescence image of microtubules of a fixed HeLa cell (6,000 frames of 100 ms).

МИКРОСКОПИЯ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ОПТИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ (STORM)

Обычная флуоресцентная микроскопия

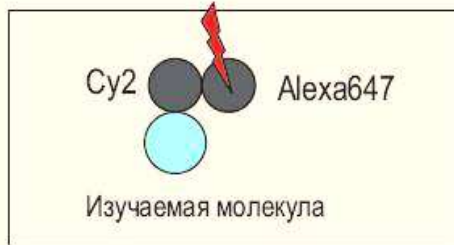


Микроскопия N-STORM

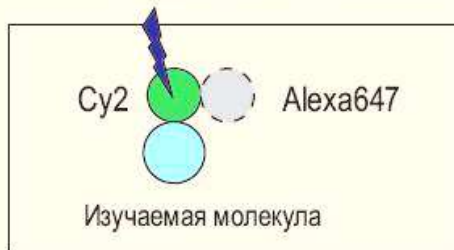


МИКРОСКОПИЯ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ОПТИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ (STORM)

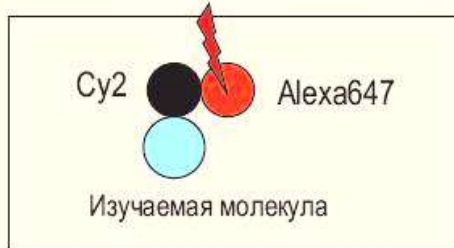
ШАГ 1 Деактивация всех молекул



ШАГ 2 Активация Alexa647 посредством облучения Cy2 светом низкой интенсивности

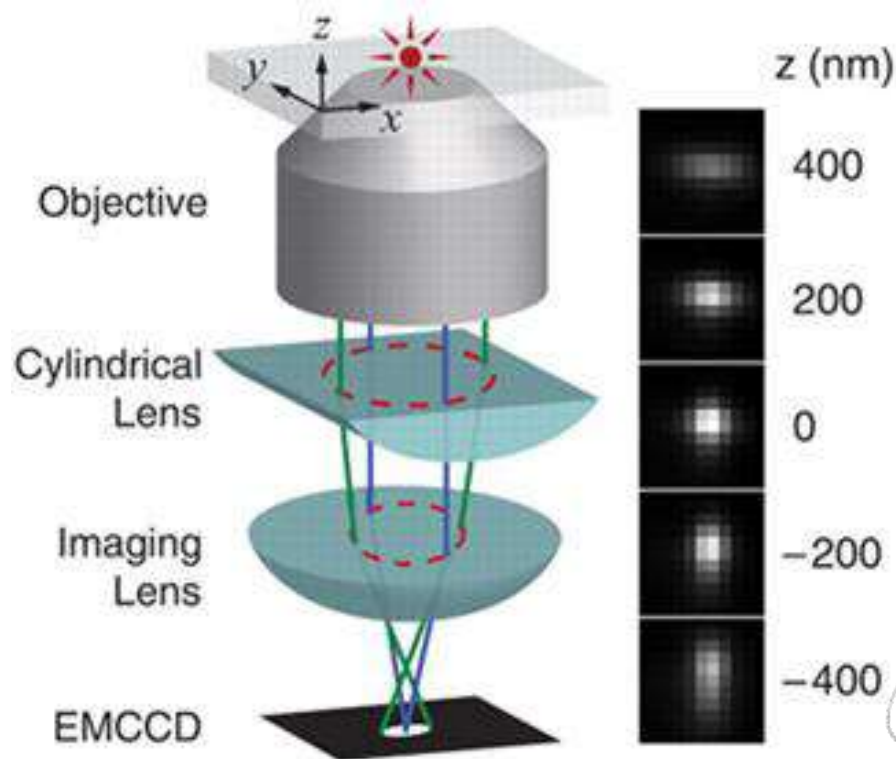


ШАГ 3 Возбуждение Alexa647 сильным светом и получение изображений локализационной информации



Повторить более 1000 раз

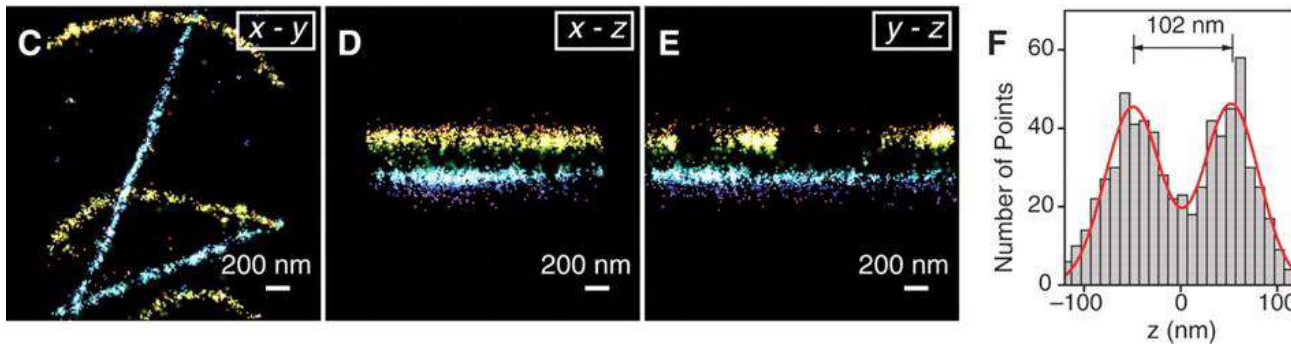
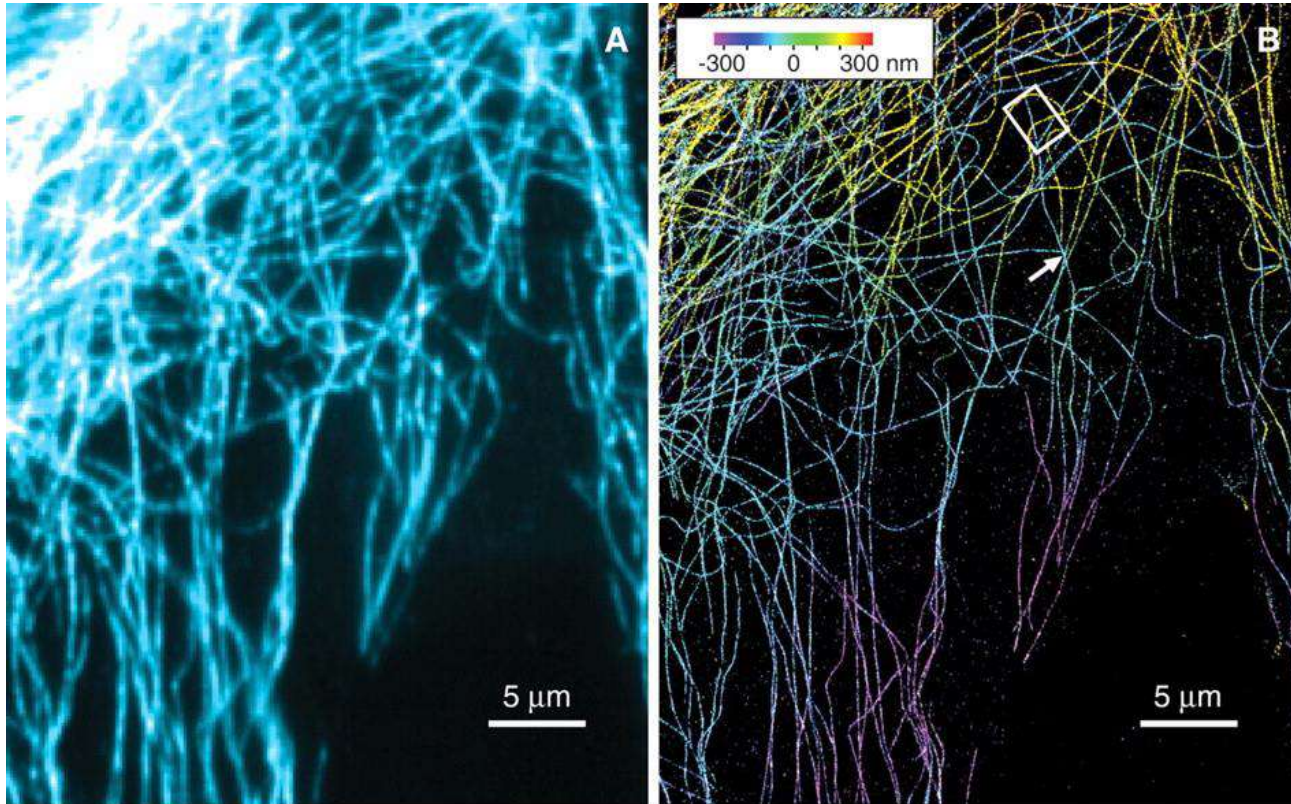
МИКРОСКОПИЯ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ОПТИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ (STORM)



Трехмерная локализация отдельных флуорофоров. Схема иллюстрирует принцип определения координат Z флуоресцентного объекта из эллиптичности его изображения.

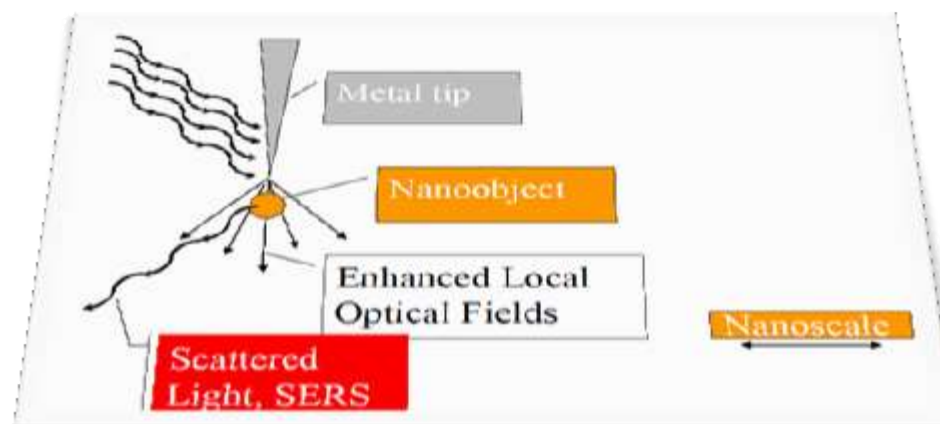
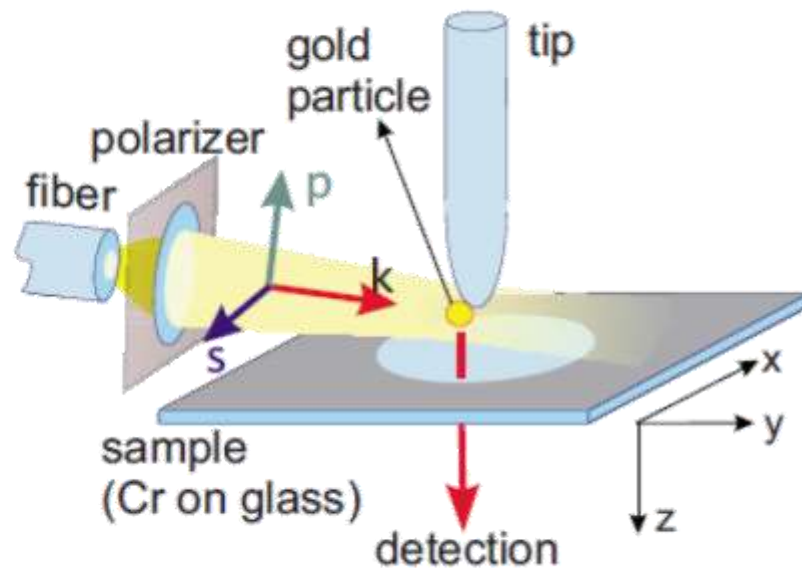
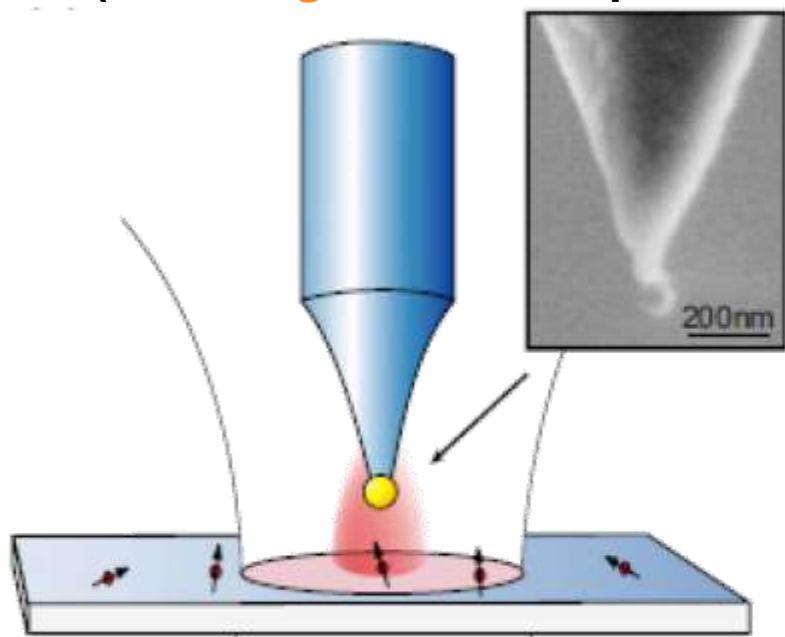


МИКРОСКОПИЯ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ОПТИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ (STORM)

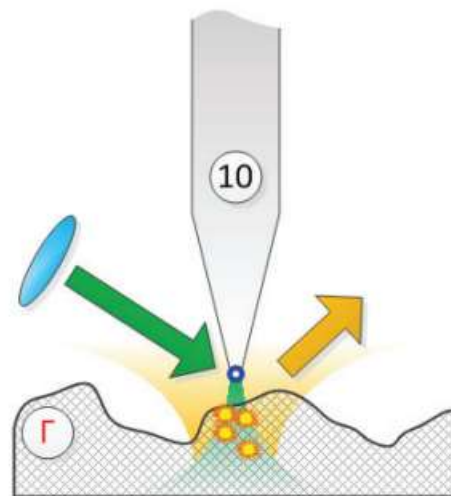
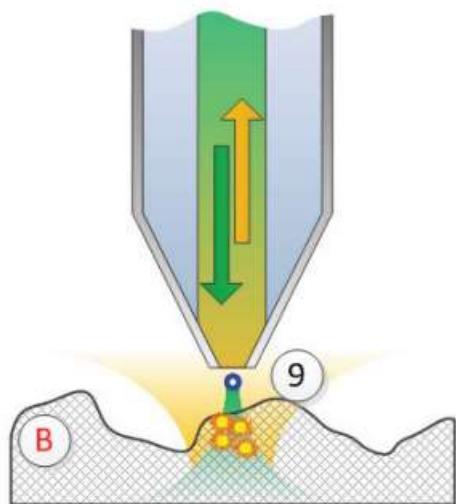
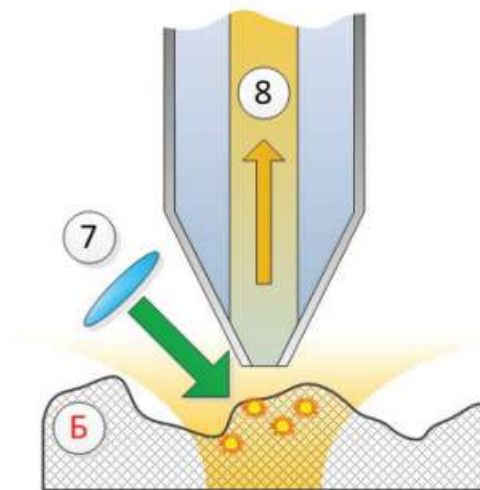
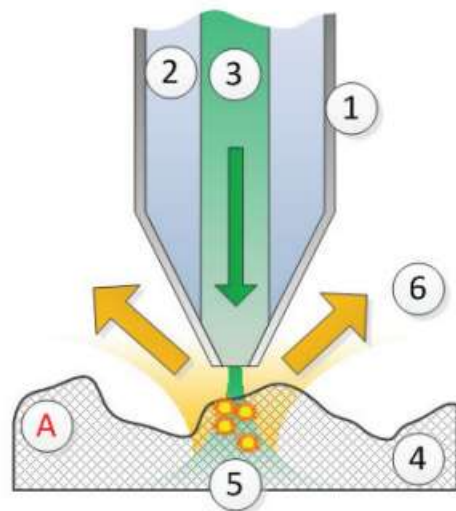


ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМОНИКИ: НАНОСКОП

(**Scanning** Near-field Optical Microscope – SNOM)



ПРИНЦИПЫ МИКРОСКОПИИ SNOM



aspire invent achieve

