

Нобелевская премия по физике 2014 года

П.С. Копьев

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, С.-Петербург, Россия

Нобелевская премия по физике 2014 года была присуждена Исаму Акасаки (I. Akasaki), Хироши Аmano (H. Amano) и Шуджи Накамура (S. Nakamura). Ниже приведена формулировка Нобелевского комитета.

“This year’s Nobel Laureates are rewarded for having invented a new energy-efficient and environment-friendly light source — the blue light-emitting diode (LED). In the spirit of Alfred Nobel the Prize rewards an invention of greatest benefit to mankind; using blue LEDs, white light can be created in a new way. With the advent of LED lamps we now have more long-lasting and more efficient alternatives to older light sources.”

«... за изобретение нового эффективного и экологичного источника света — синего светодиода. В духе Альфреда Нобеля премия присуждается за изобретения, принесшие наибольшую пользу человечеству; используя синие светодиоды, можно создавать источники белого света новым способом. С созданием светодиодных ламп мы сейчас имеем более долговечные и более эффективные источники света по сравнению с ранее использовавшимися».

В лекции будет рассказано об истории создания твердотельных источников света и об основных достижениях нобелевских лауреатов в решении этой задачи.

Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения с визуализацией одиночных молекул (Нобелевская премия по химии 2014 года)

А.В. Наумов

Институт спектроскопии РАН, 142190 Троицк, Москва

Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

Спектроскопия и флуоресцентная микроскопия одиночных точечных излучателей (органических молекул, полупроводниковых и диэлектрических нанокристаллов — квантовых точек) — относительно молодое и актуальное научное направление, имеющее ярко выраженный междисциплинарный характер [1–5]). Высокая значимость данного направления науки была подтвер-

ждена присуждением Нобелевской премии по химии 2014 года У. Мёрнеру, Э. Бетцигу и Ш. Хеллю за развитие методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (наноскопии). В настоящей лекции обсуждаются история развития, достижения и перспективы данного направления.

Введение

Оптическая микроскопия — один из старейших инструментов, сохраняющий свою высокую междисциплинарную значимость. Начиная с исследований Аббе в 1870-х гг., стало понятно, что пространственное разрешение классического оптического микроскопа имеет предел, определяемый дифракцией света, и составляет примерно половину длины волны регистрируемого излучения (т.е. в видимой области спектра $\sim 200\text{--}300$ нм).

К настоящему времени разработан целый ряд методов, позволяющих восстановить субдифракционную структуру материала: электронная, атомно-силовая, ближнеполевая сканирующая, рентгеновская микроскопия. Однако эти методы не лишены недостатков, затрудняющих их широкое использование для нанодиагностики структуры и динамики образцов, особенно в тех случаях, когда речь идет об оперативности исследования, простоте процедуры измерения, необходимости диагностики структуры и динамики объекта, его поверхности и объема. Развитие методов лазерной флуоресцентной микроскопии позволило исследователям преодолеть (именно преодолеть, а не «отменить») классический дифракционный предел в оптической микроскопии.

Одиночные молекулы

Первая группа методов оптической «наноскопии» основана на детектировании одиночных флуоресцирующих молекул. Для реализации этой идеи нужно добиться отдельного (селективного) детектирования отдельных молекул, то есть перейти от регистрации одновременного свечения огромного ансамбля молекул к предельно малым концентрациям и, далее, к одиночным молекулам (ОМ).

Здесь нужно отметить вклад отечественных ученых в развитие спектроскопии органических молекул. В 1952 году сотрудники кафедры теоретической физики Московского государственного педагогического института под руководством Э. В. Шпольского впервые наблюдали эффект возникновения квазилинейчатых спектров сложных органических соединений в специально подобранных растворителях при низких температурах. Для этого молекулы фиксировались в прозрачных замороженных матрицах. При криогенных температурах спектры внедренных молекул становятся очень узкими. Тогда появляется возможность возбуждать, заставляя светиться не все молекулы, а их

отдельные «ансамбли». В 1972 году ученик Шпольского профессор Р.И. Персонов с коллегами добились в Институте спектроскопии АН СССР успеха по селективному лазерному возбуждению свечения органических молекул. Затем, в 1974 году лаборатория Персонова и его коллеги из Института физики в Тарту провели пионерские опыты по «выжиганию спектральных провалов», когда с помощью лазера часть молекул «переводилась в безызлучательное состояние», не светилась. Эти работы легли в основу направления селективной лазерной спектроскопии молекул, кульминационным достижением которого стала спектроскопия одиночных молекул (СОМ) [1].

В 1989 г. У. Мёрнер и Л. Кадор продемонстрировали возможность регистрации спектров поглощения ОМ [6], а спустя всего несколько месяцев в 1990 г. М. Оррит и Дж. Бернанд убедительно доказали в эксперименте возможность детектирования флуоресцентного свечения ОМ в твердой матрице при криогенных температурах [7]. За 25 лет, прошедших с первых экспериментов, данное направление интенсивно развивалось и стало одним из наиболее актуальных в физической химии, биофизике и смежных науках.

Особенно интенсивно данное направление стало развиваться с появлением новых искусственных люминофоров — молекулярных комплексов, металлорганических и гибридных излучателей, полупроводниковых и диэлектрических нанокристаллов (квантовых точек, КТ), поскольку появилась возможность синтеза люминесцирующих нанообъектов с заданными фотофизическими характеристиками. Так, полупроводниковые и диэлектрические КТ обладают рядом необычных фотофизических и спектральных свойств, которые определяются их локальной структурой, размерами и микроскопическими особенностями взаимодействия с ближайшим окружением.

Все возрастающий интерес к СОМ обусловлен рядом причин:

- Физические и физико-химические свойства вещества могут быть исследованы с ее помощью на уровне одиночных молекул.
- Оптические спектры и спектральная динамика одиночных примесных люминофоров, внедренных в изучаемую прозрачную матрицу в качестве нанозондов, содержат беспрецедентно богатую информацию как о самих излучателях, так и о параметрах ближайшего окружения. Таким образом, по спектрам ОМ может исследоваться локальная динамика матрицы, а также ближнеполевое влияние структуры материала на фотофизические характеристики излучателей.
- Регистрация люминесцентных изображений одиночных точечных излучателей в схеме сканирующего конфокального микроскопа или классического люминесцентного микроскопа с двумерным детектором позволяет реконструировать координаты источника с субдифракционной

(нанометровой) точностью, которая ограничена только стабильностью установки, отношением сигнал к шуму регистрируемого излучения и размерами самого точечного источника.

- Открываются захватывающие перспективы прикладного использования СОМ. Например, разрабатываются источники неклассического света (одиночных фотонов) для квантовой информатики, ОМ используются в качестве ультрачувствительных наносенсоров и метрологических наноинструментов, развиваются приложения для скоростной расшифровки ДНК и проточной цитометрии.

Микроскопия с реконструкцией изображений ОМ

Фотоны люминесценции ОМ формируют изображение точечного источника света. Анализ изображения ОМ с учетом определенной формы аппаратной функции точечного источника позволяет определить положение (координаты) ОМ с погрешностью, которая ограничена только стабильностью установки, отношением «сигнал к шуму» регистрируемого излучения и размерами самого точечного источника, и может существенно превосходить дифракционный предел. (Рис. 1 а-в) Для этого необходимо проводить компьютерный анализ изображения ОМ (КТ), зарегистрированного с использованием люминесцентного микроскопа с многоканальной системой регистрации на основе высокочувствительного 2D-матричного детектора или с использованием сканируемого конфокального микроскопа с одноканальным детектором. Точность локализации ОМ (КТ) определяется полуэмпирической формулой [7]:

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{\Gamma_{PSF}^2 + a^2/12}{N}\right) \left(\frac{16}{9} + \frac{8\pi\Gamma_{PSF}^2 f_0^2}{a^2 N}\right)}, \quad (1)$$

где N — количество зарегистрированных фотонов люминесценции излучателя, a — размер пикселя детектора, f_0 — средний уровень паразитного сигнала, Γ_{PSF} — «обобщенная ширина» PSF. При стандартных параметрах современных установок это дает точность восстановления координаты ОМ (КТ) ~ 10 нм при детектировании 1000-2000 фотонов полезного сигнала люминесценции излучателя. Для наиболее ярких хромофоров такое количество фотоотчетов может быть достигнуто при экспозициях от нескольких мс.

В то же время задачи диагностики протяженных объектов, как правило, требуют детектирования значительного количества ОМ и их высокой пространственной плотности. В этом случае одновременное свечение тысяч молекул не позволяет различить изображения одиночных точечных источников — идентификация и определение точных положений ОМ становятся

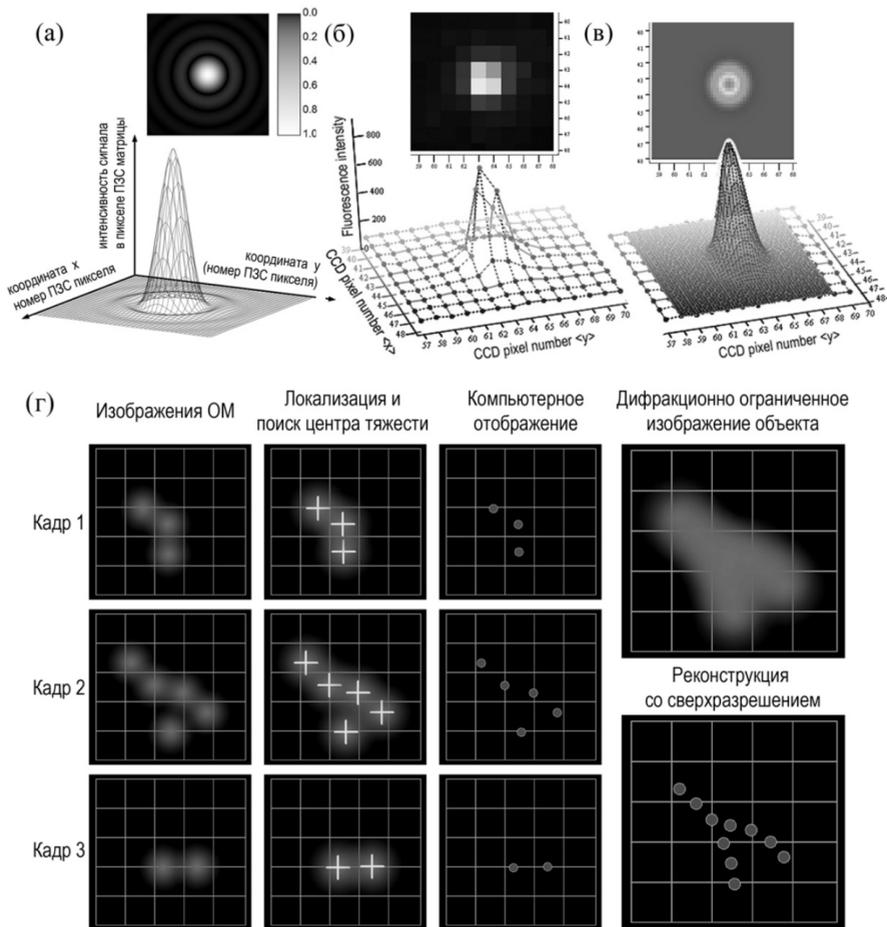


Рис. 1. (а) Аппаратная функция идеального точечного источника света — функция Эйри. (б) Пример флуоресцентного изображения ОМ (террилен) в полимерной пленке при резонансном лазерном возбуждении в области $\lambda = 575$ нм при температуре 4.3 К. В простейшем случае относительные поперечные координаты молекулы могут быть рассчитаны нахождением «центра тяжести» изображения (centroid approximation): $x_c = 22,3 \mu\text{м}$; $y_c = 32,3 \mu\text{м}$. (в) Определение поперечных координат ОМ путем аппроксимации изображения двумерной функцией Гаусса: $x_c = 22 \mu\text{м}$ $240 \text{ нм} \pm 40 \text{ нм}$; $y_c = 32 \mu\text{м}$ $350 \text{ нм} \pm 30 \text{ нм}$ [1]. (г) Иллюстрация к техникам PALM/STORM. Восстановление координат ОМ, изображения которых наблюдаются в разные моменты времени вследствие мерцания.

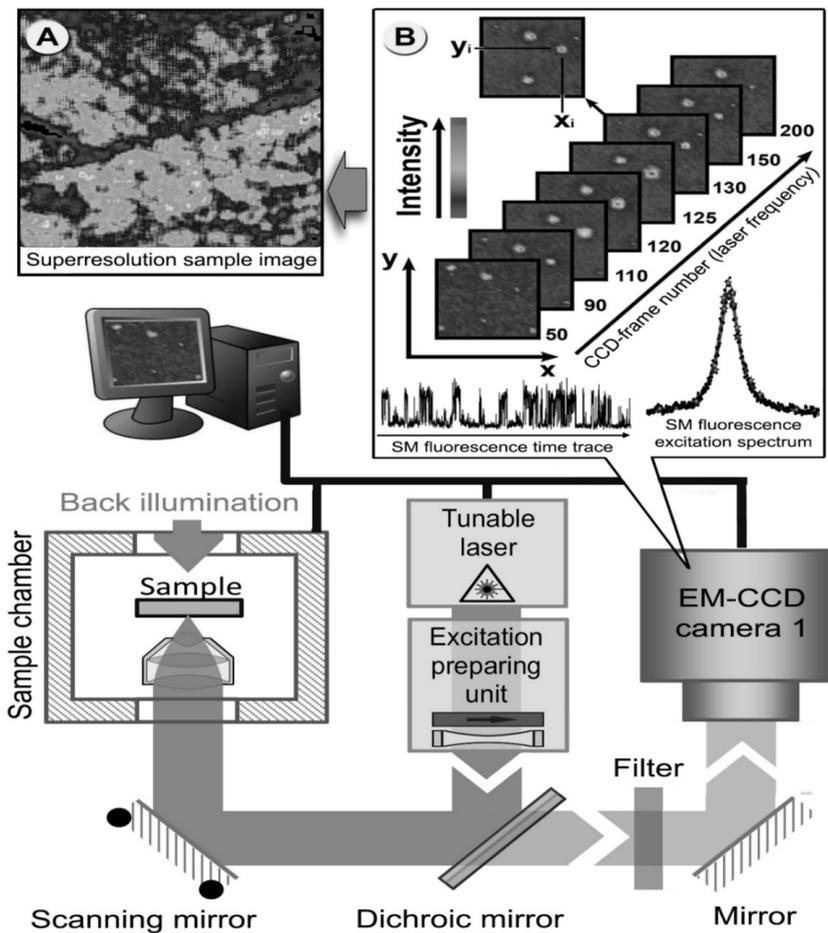


Рис. 2. Схема установки — эпи-люминесцентного микроскопа одиночных молекул и наноструктур и иллюстрация к технике криогенной спектроскопии со спектрально селективным возбуждением бесфоновых линий ОМ.

невозможными. Обойти это затруднение возможно, если разные ОМ излучают в разные моменты времени, либо различая ОМ, находящиеся внутри общего дифракционного предела по дополнительному признаку или свойству.

Существует несколько методов, позволяющих реализовать эту идею. Наибольшее распространение к настоящему времени получила техника, в основе которой лежит явление мерцания флуоресценции одиночных квантовых объектов. Случайное прерывание флуоресценции (мерцание) отдельных молекул происходит в разные моменты времени. Таким образом, при достаточно низкой концентрации примесных молекул в каждый момент времени внутри дифракционно ограниченного объема образца люминесцирует только одна молекула, что и позволяет зарегистрировать ее изображение и, как следствие, координаты (Рис. 1 г). Эта идея была реализована в техниках Photoactivation Localization Microscopy (PALM) [8] и Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) [9]. В самые последние годы были разработаны методы, которые позволяют определять с нанометровой точностью все три координаты излучателя [2,10].

Особый интерес в развитии обсуждаемого направления является наноскопия при криогенных температурах, когда возможна регистрация бесфононных спектральных линий (БФЛ) одиночных примесных молекул. БФЛ, соответствующие чисто электронным переходам в примесных молекулах, чрезвычайно чувствительны к параметрам ближайшего окружения. Указанное обстоятельство открывает уникальную возможность исследования на микроскопическом уровне внутренней динамики твердотельных сред, а также позволяет осуществлять диагностику структуры и внутренней динамики материала со сверхвысоким пространственным разрешением (см. обзоры [1,2] и ссылки там). Кроме того флуоресценция ОМ возбуждается целенаправленно путем перестройки частоты возбуждающего узкополосного лазера. Таким образом достигается высокая плотность визуализированных отдельно молекул-зондов, что позволяет реализовать многоцветовую (гиперспектральную) нанодиагностику исследуемого материала (Рис. 2).

Микроскопия с подавлением спонтанного излучения

Параллельно с «одномолекулярными» методиками в середине 2000-х гг. успешно развивалась вторая группа методов оптической наноскопии, основанных на манипулировании с параметрами возбуждающего излучения и нелинейном отклике исследуемой среды. Специфический подбор параметров возбуждающего лазерного излучения позволяет существенно уменьшить характерные размеры аппаратной функции микроскопа. В частности, в технике stimulated emission depletion (STED) [11] эффективный объем материала, из

которого регистрируется флуоресценция, уменьшается за счет перевода в безызлучательное (на рабочей длине волны) состояние части молекул по краям пятна засветки сфокусированного лазерного излучения. Обеднение флуоресценции достигается за счет второго лазера с заданным поперечным профилем пучка. В данном случае приходится использовать технику сканирующей конфокальной микроскопии, однако базис техники все тот же — в случае, когда регистрируется излучение от агломерации молекул с размерами существенно меньше длины волны света, возможно определение координат этих молекул с субдифракционной точностью.

Применения и перспективы

На основе методов STED, PALM, STORM созданы первые коммерческие оптические «наноскопы» — микроскопы сверхвысокого разрешения, оборудованные лазерными источниками, ультрачувствительными детекторами и мощными компьютерами, которые позволяют быстро распознавать и восстанавливать изображения. Разработанные методы и инструменты уже оказались широко востребованы в биохимии, биофизике и смежных науках, а также открывают новые перспективы в области наносенсорики, материаловедения, квантовой оптики и нанотехнологий.

В лекции представлены результаты исследований, поддержанных грантом Российского Научного Фонда (14-12-01415: развитие статистических методов исследования люминесценции одиночных нанообъектов); Российского Фонда Фундаментальных Исследований (14-02-00822: оптическая 3D-нанодиагностика твердых сред; 14-29-07270: наносенсорика и нанодиагностика материалов на основе СОМ). Исследования полупроводниковых КТ проводятся в рамках Программы ПРАН «Фундаментальные и прикладные проблемы фоники и физика новых оптических материалов».

Литература

- [1] А.В. Наумов, *УФН*, **183**, 633 (2013).
- [2] A. Naumov, I.Y. Eremchev, A.A. Gorshchev, *European Phys. J. D*, **68**, 348 (2014).
- [3] *Nature Photonics*, **3**, 361 (2009).
- [4] *Physical Chemistry Chemical Physics*, **13**, 1697–1900 (2011).
- [5] *Chemical Society Reviews*, **43**, 963 (2014).
- [6] W.E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.*, **62**, 2535 (1989).
- [7] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.*, **65**, 2716 (1990).
- [8] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, *et al.*, *Science*, **313**, 1642 (2006).
- [9] M.J. Rust, M. Bates, X.W. Zhuang, *Nature Methods*, **3**, 793 (2006).
- [10] S.R.P. Pavani, M.A. Thompson, J.S. Biteen, *et al.*, *Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (2009).
- [11] S.W. Hell, *Science*, **316**, 1153 (2007).