

# METODE SUPER-LOČLJIVE OPTIČNE MIKROSKOPIJE

MONIKA KOREN

Fakulteta za matematiko in fiziko  
Univerza v Ljubljani

Predstavljene so tri metode super-ločljive optične mikroskopije. Prva metoda omogoča ločljivost pod uklonsko limito zaradi zmanjševanja fluorescence s stimuliranim sevanjem. Takšna mikroskopija se je razvila na podlagi opisane fluorescenčne konfokalne mikroskopije. Druga, ultra-hitra absorpcijska mikroskopija, temelji na nasičeni absorpciji. Nazadnje je opisana še absorpcijska mikroskopija, ki izkorišča nelinearnost prehodne absorpcije in diferenčno osvetljevanje vzorca.

## SUPER-RESOLUTION MICROSCOPY TECHNIQUES

Three super-resolution microscopy techniques are presented. The first one allows a resolution below the diffraction limit due to fluorescence depletion by stimulated emission. It was developed on the basis of fluorescence confocal microscopy, which is also described. The second, ultra-fast absorption microscopy, is based on saturated absorption. Finally, the absorption microscopy is described, which takes advantage of nonlinearity in the transient absorption and differential illumination of the sample.

### 1. Uvod

Konec 17. stoletja je Anton van Leeuwenhoek izdelal prvi mikroskop z 270-kratno povečavo. Uporaba mikroskopa je takrat sicer prinesla precej zanimivih odkritij, vendar se mikroskop naslednjih 200 let ni veliko spreminjal. Šele v drugi polovici 19. stoletja je Carl Zeiss v sodelovanju z Ottom Schottom in Ernstom Abbejem znatno izboljšal kvaliteto leč in posledično mikroskopa. V sklopu tega je Abbe izpeljal teoretično spodnjo mejo ločljivosti, ki je odvisna od valovne dolžine svetlobe [1].

Pri manjših valovnih dolžinah je ločljivost boljša, na podlagi česar so nastali elektronski mikroskopi, ki vzorec osvetlujejo s snopom elektronov. Omogočajo opazovanje tisočkrat manjših objektov kot pri svetlobnem mikroskopu, vendar so precej občutljivi na zunanje vibracije in magnetna polja. Poleg tega morajo biti vzorci opazovani v vakuumu in ustrezno pripravljene, da so bolj stabilni, kar jih lahko spremeni.

Zaradi tega so se razvijale tudi različne tehnike optične mikroskopije in izkazalo se je, da lahko na več načinov izboljšamo ločljivost svetlobnih mikroskopov. Tri takšne metode so predstavljene v tem seminarju. Prva je STED mikroskopija, ki je uporabna za biološke vzorce, medtem ko za trdnine ni primerna. S pomočjo stimuliranega sevanja zadušimo fluorescenco in tako omejimo opazovano območje vzorca na velikost, manjšo od valovne dolžine svetlobe. Nato je predstavljena ultra-hitra absorpcijska mikroskopija, ki temelji na nasičeni absorpciji. Omogoča preučevanje več različnih vzorcev kot STED mikroskopija, vendar morajo tudi ti zadoščati nekaterim specifičnim pogojem. Da bi razširili uporabnost absorpcijske mikroskopije na še več različnih materialov, so leta 2016 razvili še nelinearno diferenčno absorpcijsko mikroskopijo, ki je opisana nazadnje.

## 2. STED mikroskopija

### 2.1 Ločljivost in uklonska limita

Prostorska ločljivost mikroskopa je najmanjša razdalja med točkama v vzorcu, ki ju še lahko razločimo. Ločljivost lahko poslabšajo optične aberacije, ki so posledica nepopolnosti optičnih elementov in nepravilne poravnave le-teh. Primarno pa je ločljivost omejena zaradi uklona svetlobe, saj se svetlobni žarki na robu odprtine uklonijo in širijo v geometrijsko senco.

Posledica navedenega je, da se pri okrogli leči svetla točka ne preslika v točko, ampak v t.i. vzorec Airyjevega diska. S pomočjo Fraunhoferjeve teorije uklona lahko za točkast izvor izračunamo porazdelitev svetlobe na zaslonu, ki je postavljen v goriščni ravnini zbiralne leče, kot

$$I(x) = I_0 \left( \frac{2J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right)^2. \quad (1)$$

$J_1$  je Besselova funkcija prvega reda,  $I_0$  maksimalna intenziteta Airyjevega diska v središču,  $k$  valovni vektor in  $a$  polmer leče.  $\theta$  je kot med optično osjo in premico, ki poteka od središča leče do točke na zaslonu.

Na sliki 1 je prikazana uklonska slika dveh točkastih izvorov svetlobe pri različnih razdaljah med njima. Rayleighjev kriterij definira minimalno razdaljo med točkovnima izvoroma, ki ju še lahko ločimo, oziroma uklonsko limito kot razdaljo med maksimumom uklonske slike prvega izvora in prvim minimumom uklonske slike drugega izvora. Minimume dobimo v ničlah Besselove funkcije, iz česar sledi, da je prvi minimum pri pogoju

$$J_1(3,83) = 0 \quad \rightarrow \quad ka \sin \theta = 3,83. \quad (2)$$

Če je razdalja med lečo in zaslonom mnogo večja od razmerja  $\frac{a^2}{\lambda}$ , kjer je  $\lambda$  valovna dolžina vpadne svetlobe, lahko zapišemo  $\sin \theta \approx \theta$ . Upoštevali smo, da je valovni vektor  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ . Pogoj, da ločimo dve točki, je torej

$$\theta > \frac{3,83}{ka} = \frac{3,83\lambda}{2\pi a} = 1,22 \frac{\lambda}{2a}. \quad (3)$$

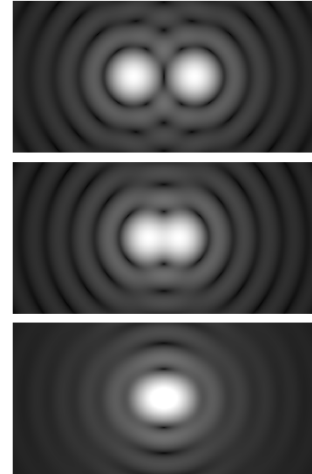
Zgornji izraz predstavlja kotno ločljivost sistema. Prostorsko ločljivost oziroma razdaljo med točkama, ki ju še lahko ločimo, označimo z  $\Delta d$ . Goriščno razdaljo leče, torej v tem primeru razdaljo med zaslonom in lečo, označimo s  $f$ . Enačbo povežemo še z numerično aperturo objektiva  $NA$ . Sedaj zapišemo

$$\sin \theta = \frac{\Delta d}{f} \approx \theta \quad \rightarrow \quad \Delta d_{min} = 1,22 \frac{\lambda}{2a} f = 1,22 \frac{\lambda}{2NA}. \quad (4)$$

Zaradi uklonske limite lahko torej najboljši svetlobni mikroskopi z  $NA \simeq 1,5$ , ki uporabljajo vidno svetlobo, dosežejo ločljivost približno  $0,2 \mu\text{m}$ . Le-to pa lahko izboljšamo z več tehnikami, ena izmed njih je STED mikroskopija, ki je nadgradnja fluorescenčne konfokalne mikroskopije.

### 2.2 Fluorescenčna konfokalna mikroskopija

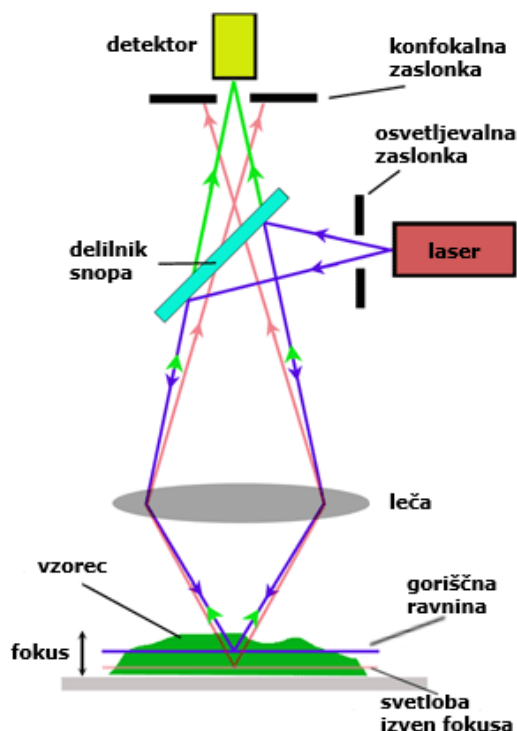
Pri konfokalni oziroma sožariščni mikroskopiji z uporabo dveh zaslonk odpravimo prispevek sipane svetlobe, kar nam omogoča boljši kontrast slike. Iz več dvodimenzionalnih slik, posnetih na različnih globinah, lahko skonstruiramo tudi tridimenzionalno sliko.



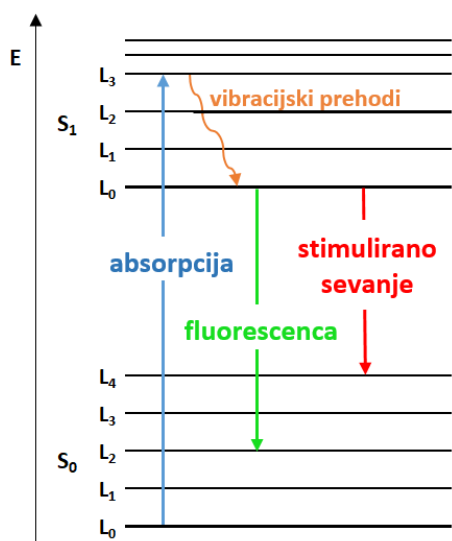
**Slika 1.** Airyjevi vzorec dveh točkastih svetlobnih izvorov na različnih oddaljenostih. Na drugi sliki je mejni primer, ko sta glede na Rayleighjev kriterij točki ravno še ločljivi. Na prvi sliki točki lahko ločimo, na tretji pa ne. Povzeto po [2].

Na sliki 2 je prikazana postavitve konfokalnega mikroskopa, kjer z laserskim izvorom svetlobe (modra črta) posvetimo na zaslonko, od koder svetloba preko delilnika snopa in leče vpada na vzorec. Od vzorca se odbije nazaj na lečo in preko delilnika snopa vpada na simetrično postavljeno zaslonko, tako da gorišče leče sovпада z obema zaslonkama. Skozi drugo zaslonko pride samo svetloba iz goriščne ravnine (zelená črta), svetloba izven goriščne ravnine (rdeča črta), ki povzroča zamegljenost slike pri klasični svetlobni mikroskopiji, pa ne.

Konfokalno mikroskopijo pogosto uporabljamo skupaj s fluorescenčno mikroskopijo za opazovanje bioloških vzorcev, označenih s fluorescenčnimi označevalci. To so kemične spojine, ki pri absorpciji svetlobe z določeno valovno dolžino izsevajo svetlobo z daljšo valovno dolžino. Fluorescenčna konfokalna mikroskopija omogoča boljši kontrast in opazovanje podrobnosti vzorcev, ki z navadno mikroskopijo niso opazne [4].



**Slika 2.** Shema konfokalnega mikroskopa, kjer opazujemo samo eno rezino vzorca. Prirejeno po [3].



**Slika 3.** Prikaz vzbujanja elektronov z absorpcijo ter fluorescenčno in stimulirano sevanje.

Na sliki 3 je prikazano delovanje spontanega sevanja oziroma fluorescence na ravni energijskih nivojev v molekuli. Vpadna svetloba vzbudi elektron iz osnovnega elektronskega stanja  $S_0L_0$  v neko vibracijsko stanje prvega vzbujenega elektronskega stanja, na primer  $S_1L_3$ , kar se zgodi na časovni skali femtosekund. Elektron v času nekaj pikosekund relaksira v osnovno vibracijsko stanje  $S_1L_0$ , nato pa izseva foton, ko preide v neko vibracijsko stanje osnovnega elektronskega stanja, denimo  $S_0L_2$ , kar se dogaja na časovni skali nanosekund [5]. Energija izsevanih fotonov je nižja od energije absorbiranih fotonov, zato ima izsevana svetloba daljšo valovno dolžino kot vpadna svetloba. Za lažjo predstavbo so zgoraj naštetih prehodi oštevilčeni, vendar je to samo primer, saj so v resnici ti prehodi odvisni od izbirnih pravil.

Za zajemanje fluorescence v shemo konfokalnega mikroskopa poleg zaslonk dodamo dva filtra, ki dodatno omejita svetlobo na točno določeno območje valovnih dolžin. Namesto delilnika snopa pa uporabimo dikroično zrcalo, ki vpadno svetlobo s krajšo valovno dolžino odbije, svetlobo fluorescence z daljšo valovno dolžino pa prepusti [4].

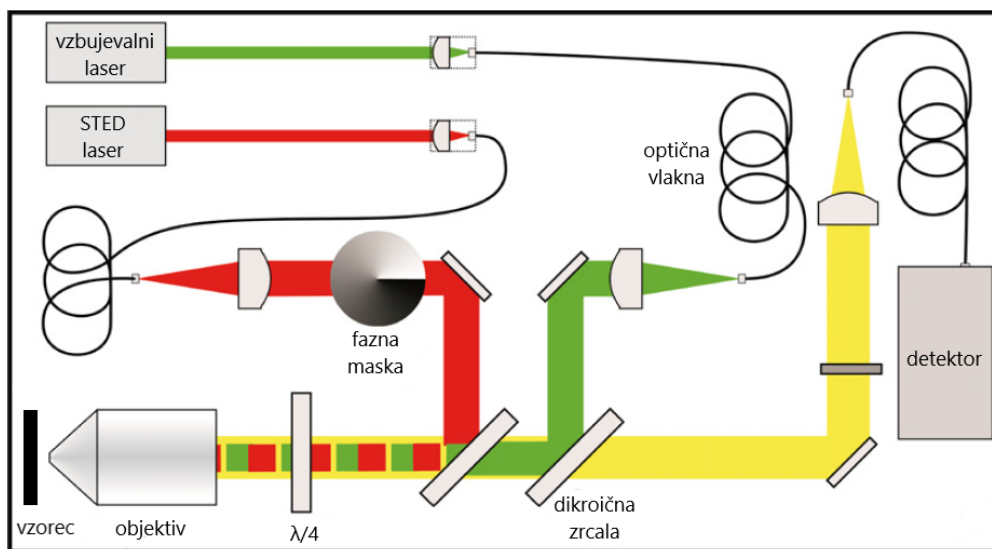
### 2.3 STED mikroskopija

Kratica STED (*Stimulated Emission Depletion*) pomeni zmanjševanje fluorescence s stimuliranim sevanjem, prikazanim na sliki 3. Gre za to, da dodatna vpadna svetloba zmoti proces fluorescence in povzroči stimulirano sevanje, še preden pride do spontanega sevanja (fluorescence). To pomeni, da lahko na izbranih mestih fluorescenco zadušimo in pustimo le majhno območje, ki bo emitiralo fluorescenčno svetlobo, kar nam znatno izboljša ločljivost. Ker je učinkovitost stimuliranega sevanja sorazmerna številu vpadnih fotonov, potrebujemo laserski izvor visoke intenzitete (v nadaljevanju STED laser). STED mikroskopija je torej fluorescenčna konfokalna mikroskopija z dodatnim laserjem, ki na izbranih mestih zaduši fluorescenco.

Bolj podrobno delovanje stimuliranega sevanja je naslednje. Vpadni foton iz STED laserja interagira z vzbujenim elektronom fluorescenčnega označevalca, ki je na sliki 3 v stanju  $S_1L_0$ . S tem povzroči, da elektron preide v višje vibracijsko stanje osnovnega elektronskega stanja  $S_0L_4$  kot pri običajni fluorescenci, kjer bi prešel na primer v stanje  $S_0L_2$ . To se zgodi pod pogojem, da frekvenca vpadnega fotona ustreza temu prehodu

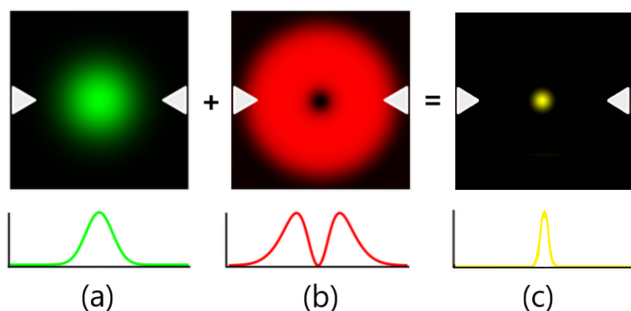
$$\nu_{STED} = \frac{E(S_1L_0) - E(S_0L_4)}{h}, \quad (5)$$

kjer je  $h$  Planckova konstanta in  $E$  energija omenjenih energijskih nivojev [5]. Energija izsevanih fotonov, ki nastanejo na osnovi stimuliranega sevanja, je manjša kot energija fotonov, ki nastanejo s spontanim sevanjem. Zato imajo izsevani fotoni preko stimulirane emisije daljšo valovno dolžino kot fotoni, ki nastanejo s fluorescenco in jih lahko ločimo.

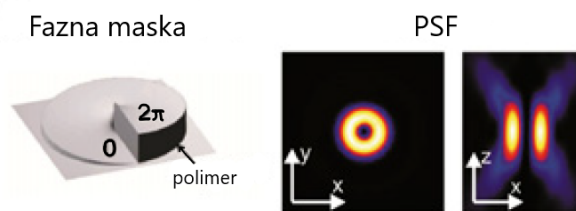


**Slika 4.** Shema STED mikroskopa, kjer svetlobna snopa iz laserja ter svetlobo iz vzorca zberemo v optična vlakna, ki nadomestijo zaslonke. Prirejeno po [6].

Za izboljšanje ločljivosti sta torej potrebna dva laserska žarka z različnima valovnima dolžinama. Na sliki 4 je prikazana postavitve STED mikroskopa, kjer je z zeleno označen vzbujevalni žarek in z rdečo STED žarek. Vzbujevalni žarek je Gaussove oblike (slika 5a) in gre direktno na vzorec (*Sample*), kjer vzbudi molekule fluorescenčnih označevalcev. Žarek iz STED laserja gre skozi fazno masko (*Phase mask*), da dobi obliko kolobarja (slika 5b) in pride do vzorca z zamikom nekaj 100 pikosekund. Tako prehitni proces fluorescence, ki sicer poteče po nekaj nanosekundah od vzbuditve. Ker ima STED žarek obliko kolobarja, povzroči stimulirano emisijo samo na obrobju zelenega vzbujenega območja, prikazanega na sliki 5a. V sredini tako ostane le majhno območje vzbujenih molekul, ki emitirajo fluorescenčno svetlobo (slika 5c). To območje je lahko dosti manjše od valovne dolžine svetlobe in ni omejeno z uklonskimi lastnostmi optičnega sistema [6].



**Slika 5.** Prečni preseki (a) vzbujevalnega žarka, (b) STED žarka in (c) končnega fluorescenčnega signala ter ustrezni intenzitetni profili skozi centre žarkov, ki jih označujejo trikotniki. Prirejeno po [7] in [8].



**Slika 6.** Shema  $2\pi$  fazne ploščice in preseki STED žarka v ravninah  $(x, y)$  in  $(x, z)$ . Prirejeno po [6].

Na sliki 4 vidimo, da gre STED žarek skozi  $2\pi$  fazno masko, ki je prikazana tudi na sliki 6. Gleddano v polarnih koordinatah, se takšni fazni ploščici s kotom  $\varphi$  spreminja debelina, zato valovanje pri različnih kotih dobi različen fazni zamik. Na tak način se osnovni Gaussov snop spremeni v Laguerre-Gaussov snop 1. reda, ki ima kolobarjast profil. Na sliki 6 je prikazan prerez takega snopa v dveh ravninah.

## 2.4 Ločljivost STED mikroskopije

Izboljšanje ločljivosti STED mikroskopije je odvisno od razmerja intenzitet STED laserja med sredino in kolobarjem. To razmerje je odvisno samo od moči STED laserja, zato lahko modificiramo enačbo za ločljivost (4) in dobimo

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + \frac{I}{I_S}}}, \quad (6)$$

kjer je  $I$  intenziteta STED žarka in  $I_S$  intenziteta nasičenja. To je intenziteta, ki je potrebna, da se fluorescenčni signal polpolovi.

Glede na dobljeni izraz v idealnem primeru ne bi bilo omejitve pri izboljšanju lateralne ločljivosti, saj se le-ta povečuje z zviševanjem moči STED laserja. Realno pa obstaja mnogo procesov, ki omejujejo ločljivost, eden pomembnejših je bledenje fluorescenčnih označevalcev, ki jih s previsoko intenziteto lahko uničimo ali spremenimo v molekule z močno zmanjšano fluorescenco [5].

## 3. Ultra-hitra absorpcijska mikroskopija

S STED mikroskopijo lahko opazujemo le materiale, označene s fluorescenčnimi označevalci. S pomočjo analognih absorpcijskih spektroskopskih tehnik, ki ne potrebujejo označevalcev, pa lahko preučujemo širši nabor vzorcev.

### 3.1 Ultra-hitra TA mikroskopija

Ultra-hitra prehodna absorpcijska (v nadaljevanju TA - *Transient Absorption*) mikroskopija je spektroskopska tehnika, ki se uporablja za opazovanje relaksacije vzbujenih elektronskih stanj preko različnih procesov, ki se dogajajo na različnih časovnih skalah. V nekaj femtosekundah po vzbuditvi elektrona iz osnovnega v vzbujeno stanje se zgodi relaksacija brez izsevanja fotona, po nekaj pikosekundah lahko opazujemo vibracijsko relaksacijo in po nekaj nanosekundah relaksacijo z izsevanjem fotona [9]. Opazovanje prehodne absorpcije na tako kratkih časovnih skalah nam omogočajo ultra-hitri sunkovni laserji.

Poleg tega je TA mikroskopija uporabna za sledenje vmesnih stanj v foto-kemičnih reakcijah, za detekcijo prenosa energije ali naboja, za določanje lastnosti polprevodniških materialov, za opazovanje fluorescenčnih ter fosforescenčnih procesov in za analizo sprememb v konformaciji molekul.

### 3.1.1 Delovanje

Pri TA mikroskopiji za osvetljevanje materiala uporabimo dva kratka sunka, imenovana črpalni žarek (ang. *pump beam*) in testni žarek (ang. *probe beam*). Intenziteta testnega žarka mora biti precej manjša od intenzitete črpalnega žarka, zato gre črpalni žarek najprej skozi ojačevalnik in nato na vzorec, kjer vzbudi del molekul. Testnemu žarku s pomočjo zrcal podaljšamo optično pot, da je glede na črpalni žarek zakasnen za časovni zamik  $\tau$ .

Ko žarka zapustita vzorec, gresta skozi filter, ki odstrani črpalni žarek. Ostane testni žarek, ki mu izmerimo absorpcijski spekter. Pri absorpcijskem spektru merimo intenziteto vpadne in prepuščene svetlobe, iz česar izračunamo absorbanco  $A$ , ki je definirana kot

$$\frac{I_{out}}{I_{in}} = 10^{-A}, \quad (7)$$

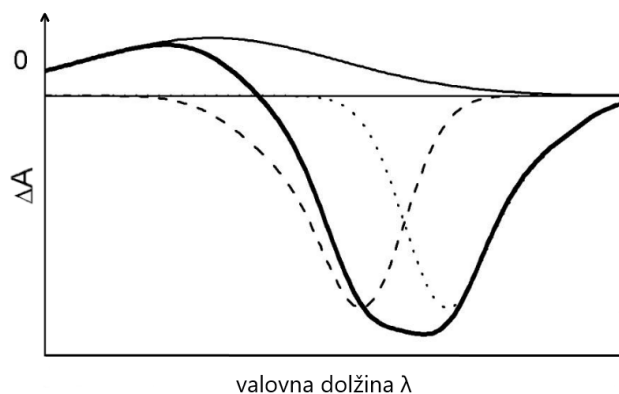
kjer je  $I_{in}$  intenziteta vpadne svetlobe in  $I_{out}$  intenziteta prepuščene svetlobe. Rezultat interakcije črpalnega žarka z vzorcem je sprememba absorbance  $\Delta A$ , jo izračunamo kot:  $\Delta A = A_v - A_o$ , kjer je  $A_v$  absorbanca vzbujenega vzorca in  $A_o$  absorbanca vzorca v osnovnem stanju. Z merjenjem  $\Delta A$  pri različnih valovnih dolžinah  $\lambda$  in različnih zakasnitvah  $\tau$  dobimo  $\Delta A$  kot funkcijo zakasnitve in valovne dolžine:  $\Delta A = \Delta A(\tau, \lambda)$ .

### 3.1.2 Sprememba absorbance

Sprememba absorbance  $\Delta A$  je posledica naslednjih procesov:

- Bledenja osnovnega stanja, ker je del molekul že vzbujen, preden do njih pride testni žarek. Zato je absorpcija le-tega manjša, kot bi bila, če bi bile vse molekule še v osnovnem stanju. Ker je absorpcija osnovnega stanja pri vzbujenem vzorcu manjša kot pri nevzbujenem, to opazimo kot negativno spremembo absorbance  $\Delta A < 0$  na območju valovnih dolžin, ki jih absorbirajo molekule v osnovnem stanju.
- Stimulirane emisije, ki jo povzročijo fotoni testnega žarka, ko trčijo v vzbujene molekule. Zaradi tega se intenziteta svetlobe na detektorju poveča in zopet dobimo negativno spremembo absorbance  $\Delta A < 0$ .
- Absorpcije vzbujenega stanja, ko testni žarek pri določenih valovnih dolžinah že vzbujene molekule vzbudi v še višje vzbujeno stanje, kar da pozitivno spremembo absorbance  $\Delta A > 0$ .
- Absorpcije produktov, saj po vzbujanju s črpalnim žarkom v fotobioloških in fotokemičnih vzorcih lahko potečejo reakcije, katerih produkt so molekularna stanja z dolgim življenjskim časom, na primer tripletna stanja, izomerna stanja in stanja, kjer pride do ločevanja elektronov od preostale molekule. Absorpcija takšnih stanj bo prinesla pozitivno spremembo absorbance  $\Delta A > 0$  [10].

Primer spremembe absorbance  $\Delta A$  v odvisnosti od valovne dolžine  $\lambda$  zaradi zgoraj omenjenih procesov je prikazan na sliki 7.



**Slika 7.** Prispevki k spektru  $\Delta A$  v odvisnosti od  $\lambda$ . Črtkana črta prikazuje bledenje osnovnega stanja, pikčasta črta stimulirano emisijo in polna tanka črta absorpcijo vzbujenega stanja. Vsota vseh je prikazana z odebeljeno črto. Prirejeno po [10].

### 3.2 Ultra-hitra STA mikroskopija

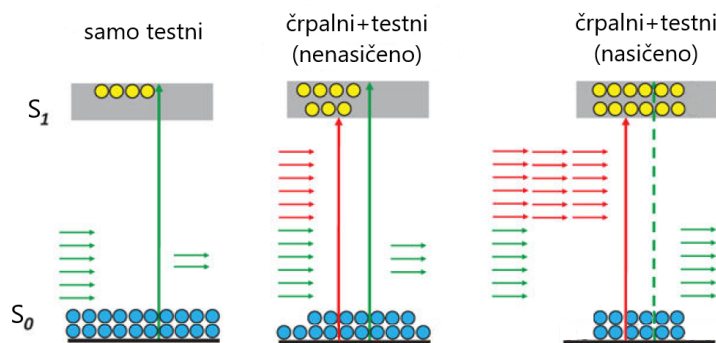
Da bi izboljšali prostorsko ločljivost običajne TA mikroskopije, so razvili tehniko slikanja na podlagi nasičene prehodne absorpcije (v nadaljevanju *STA-saturated transient absorption*). Princip je podoben kot pri STED mikroskopiji, le da v tem primeru na robu vzbujenega območja namesto fluorescence zmanjšamo absorpcijo, kar dosežemo z nasičenjem.

#### 3.2.1 Nasičena absorpcija

Pri majhnih intenzitetah vpadne svetlobe je absorpcija v snovi linearna, pri večjih intenzitetah pa se absorpcija nelinearno zmanjšuje. Gre za to, da vpadna svetloba vzbuja elektrone iz osnovnega v vzbujeno stanje tako hitro, da se zasedenosti osnovnega in vzbujenega stanja izenačita, še preden imajo vzbujeni elektroni čas preiti nazaj v osnovno stanje. Ko se verjetnosti za absorpcijo in stimulirano emisijo izenačita, absorpcija postane nasičena. Z večanjem intenzitete je verjetnost za absorpcijo vse manjša.

#### 3.2.2 Delovanje

Na sliki 8 je prikazan pojav nasičenja absorpcije v dvo-nivojskem sistemu. Na levi sliki se fotoni iz testnega žarka absorbirajo, pri čemer vzbudijo sistem iz stanja  $S_0$  v stanje  $S_1$ , zato je absorpcija znatna. Na sredinski sliki dodamo črpalni žarek, ki zmanjša število elektronov v stanju  $S_0$ , zato se absorpcija testnega žarka zmanjša. Na tak način deluje običajna TA mikroskopija. Če je intenziteta



**Slika 8.** Prikaz absorpcije testnega žarka na vzorcu. Na prvi sliki na vzorec pade samo testni žarek. Na drugi sliki pred testnim žarkom na vzorec pade črpalni žarek, ki že vzbudi nekaj elektronov. Na tretji sliki črpalni žarek povzroči nasičenje absorpcije za testni žarek. Prirejeno po [11].

črpalnega žarka zelo visoka, pa se prehod elektronov nasiči (desna slika), saj se verjetnosti za absorpcijo in stimulirano emisijo izenačita in sta zasedenosti stanja  $S_0$  in  $S_1$  enaki. V tem primeru popolnoma zadušimo absorpcijo testnega žarka in njegova intenziteta se ne spremeni.

Za izboljšanje prostorske ločljivosti je tako potrebno črpalnemu in testnemu žarku dodati še t. i. nasičeni žarek v obliki krožnega kolobarja. Slednji ima enako valovno dolžino kot črpalni žarek, ampak dosti večjo intenziteto, zato na robu vzbujenega območja povzroči nasičenje absorpcije in intenziteta testnega žarka se tam ne spremeni. Spremembo absorbance testnega žarka tako zaznamo samo na majhnem območju znotraj kolobarja nasičenega žarka, kar znatno izboljša ločljivost [11].

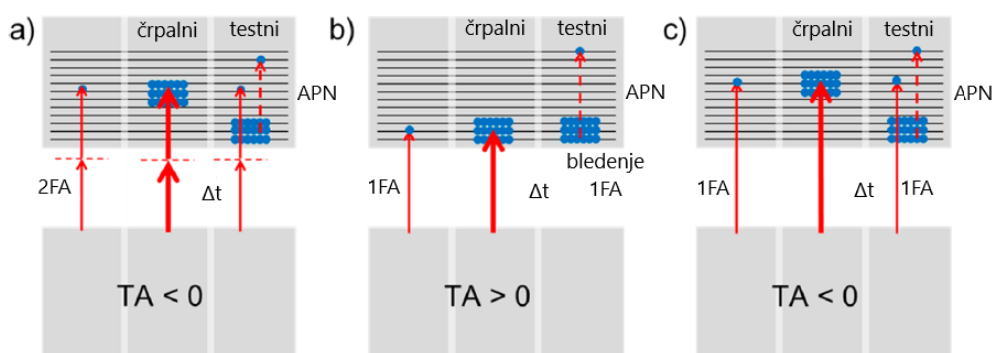
#### 4. Nelinearna diferenčna absorpcijska mikroskopija

Pri večini materialov pride do nasičene absorpcije šele pri zelo visoki intenziteti, pogosto tik preden pride do optičnih poškodb materiala, zato je uporaba STA mikroskopije omejena. Da bi povečali uporabnost super-ločljivih TA tehnik, so raziskovalci razvili metodo, ki izkorišča nelinearnost prehodne absorpcije, vendar ne zahteva nasičene absorpcije.

Nelinearna diferenčna absorpcijska (v nadaljevanju DTA - *differential transient absorption*) mikroskopija poleg nelinearnosti prehodne absorpcije za delovanje potrebuje tudi diferenčno osvetljevanje vzorca oziroma izmenjevanje valovnih front dveh črpalnih žarkov. V nadaljevanju je predstavljen eksperiment<sup>1</sup> v katerem so avtorji na primeru CdSe nanotrakov analizirali dva načina (linearni in nelinearni), s katerima lahko z DTA metodo dobimo prostorsko ločljivost pod uklonsko limito. V dotičnem eksperimentu so avtorji definirali TA signal kot razliko spremembe absorbance med vzbujanjem vzorca samo s testnim žarkom  $\Delta A_t$  in spremembo absorbance med vzbujanjem s kombinacijo testnega in črpalnega žarka  $\Delta A_{t+c}$ :  $TA = \Delta A_t - \Delta A_{t+c}$ .

##### 4.1 Nelinearnost absorpcije

Da bi razumeli, zakaj pride do nelinearnosti absorpcije, moramo najprej preučiti različne prispevke k TA signalu. Na sliki 9 so prikazani diagrami energijskih pasov, kjer vidimo vzbuditev nabojev iz valenčnega v prevodni pas in tri absorpcijske procese, ki vplivajo na TA signal: enofotonsko (1FA) in dvofotonsko (2FA) absorpcijo ter absorpcijo zaradi vzbujanja prostih nosilcev naboja (APN) oz. inducirano absorpcijo. Prikazano je tudi bledenje absorpcije (bledenje 1FA), ko se testni žarek zaradi povečane gostote nosilcev naboja v prevodnem pasu težje absorbira z enofotonsko absorpcijo. Črpalni žarek namreč vzbudi precej nosilcev naboja in s tem zmanjša njihovo populacijo v valenčnem pasu ter poveča njihovo gostoto v prevodnem pasu.



**Slika 9.** Energijski pasovi v polprevodniku in absorpcijski procesi, ki prispevajo k TA signalu, pri različnih valovnih dolžinah vpadne svetlobe, ki se od leve (a) proti desni (c) krajša. Energija vpadne svetlobe se torej od leve (a) proti desni (c) povečuje. Ti procesi so: absorpcija zaradi vzbujanja prostih nosilcev naboja (APN), enofotonska absorpcija (1FA) in dvofotonska absorpcija (2FA). Prirejeno po [13].

Pri daljših valovnih dolžinah vpadne svetlobe, pri katerih je energija fotonov manjša od energijske reže, lahko testni žarek elektrone vzbudi samo z dvofotonsko absorpcijo (9a levo). Črpalni žarek z dvofotonsko absorpcijo povzroči povečanje gostote nosilcev naboja v prevodnem pasu (9a sredina). Ta po času  $\Delta t$ , ki tipično znaša manj kot pikosekundo, relaksira na dno prevodnega pasu. Testni žarek (9a desno) je zakasnjjen za nekaj pikosekund in ko pride do vzorca, se območje nasičenja elektronov že premakne na dno prevodnega pasu. Testni žarek tako lahko z dvofotonsko absorpcijo (2FA) vzbudi elektrone iz valenčnega v prevodni pas, hkrati pa vzbudi tudi elektrone, ki so že v

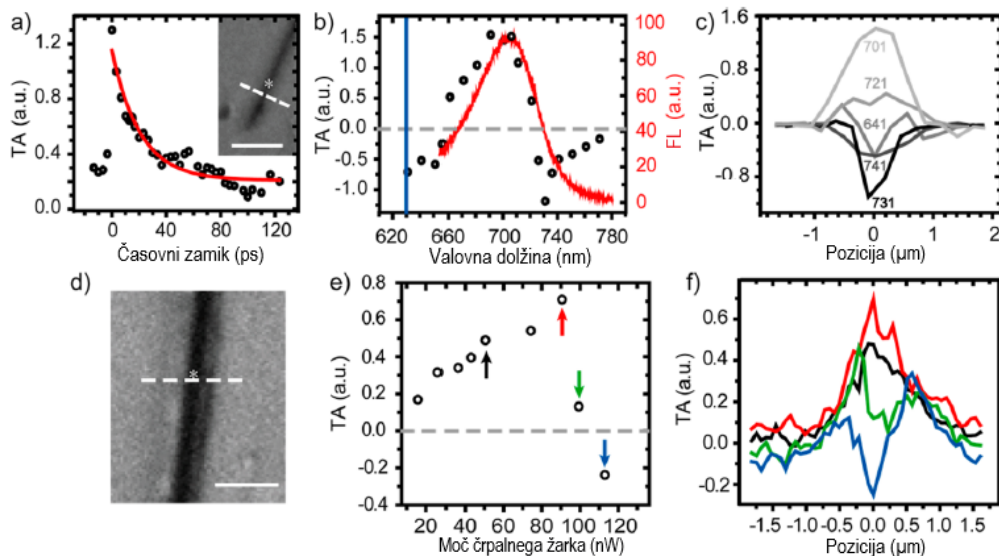
<sup>1</sup>Povzeto po [13].



prevodnem pasu (APN). Absorpcija testnega žarka v kombinaciji s črpalnim žarkom je torej večja kot absorpcija samo testnega žarka (9a levo), zato je TA signal negativen.

Pri krajših valovnih dolžinah je energija fotonov večja od energijske reže, zato testni žarek lahko elektrone vzbudi z enofotonsko absorpcijo (9b levo). Črpalni žarek povzroči povečanje gostote naboja na dnu prevodnega pasu (9b sredina). Rekombinacija teh nabojev se dogaja na časovni skali nekaj deset pikosekund, testni žarek pa je zakasnen le za nekaj pikosekund, zato povečanje gostote nabojev v prevodnem pasu povzroči bledenje enofotonske absorpcije. Testni žarek se namreč zaradi tega težje absorbira (9b desno). Absorpcija testnega žarka v kombinaciji s črpalnim je torej manjša kot samo pri testnem žarku in TA signal je pozitiven. Vendar se to dogaja samo pri majhnih intenzitetah črpalnega žarka, pri velikih črpalnih močeh pa se v prevodnem pasu nabere že toliko elektronov, da absorpcija testnega žarka na že vzbujenih prostih nosilcih naboja prevlada nad bledenjem absorpcije, kar prinese  $TA < 0$ . V resnici zgoraj omenjena procesa stalno tekmujeta, kateri bo prevladal, kar dejansko povzroči nelinearnost absorpcije.

Pri še krajših valovnih dolžinah testni žarek z enofotonsko absorpcijo vzbudi elektrone daleč v prevodni pas (9c levo). Črpalni žarek torej daleč v prevodnem pasu povzroči povečano gostoto nabojev (9c sredina), ki za relaksacijo do dna prevodnega pasu potrebuje nekaj manj kot pikosekundo. Ker je testni žarek zakasnen za nekaj pikosekund, ni povečane gostote naboja, ki bi preprečevala enofotonsko absorpcijo (9c desno). Poleg enofotonske absorpcije se testni žarek absorbira tudi z vzbujanjem prostih nosilcev naboja, enako kot pri 9a. Tako je TA signal zopet negativen.



**Slika 10.** Prehodna absorpcija TA, izmerjena za nanotrak NB1, prikazan na sliki a) (skala:  $3 \mu\text{m}$ ) in nanotrak NB2, prikazan na sliki d) (skala:  $2 \mu\text{m}$ ). (a) Amplituda TA signala v odvisnosti od zamika med črpalnim in testnim žarkom, izmerjena na sredini nanotraku NB1 (\*). (b) Amplituda TA signala in fotoluminiscenčni spekter (NB1 vzbujen pri 630 nm) v odvisnosti od valovne dolžine, posneta vzdolž črtkane črte nanotraku NB1. (c) TA mikroskopija posneta vzdolž črtkane črte nanotraku NB1, pri različnih valovnih dolžinah. (e) TA amplituda v odvisnosti od moči Gaussovega črpalnega žarka, na sredini nanotraku NB2 (\*). (f) TA mikroskopija, posneta vzdolž črtkane črte nanotraku NB2, pri črpalnih močeh, ki se ujemajo s črno, rdečo, zeleno in modro puščico na sliki e). Vse meritve so bile opravljene z Gaussovimi črpalnimi žarkom.

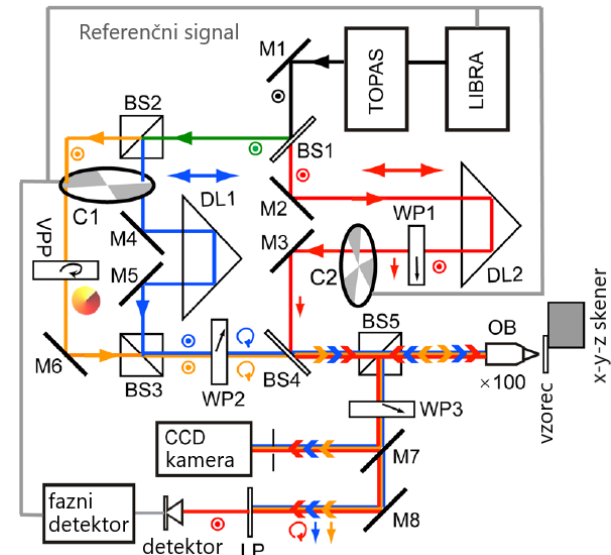
Predznak TA signala je torej odvisen od intenzitete črpalnega žarka in od valovne dolžine, kar je prikazano na sliki 10. Opazimo lahko, da na sliki 10b med valovnimi dolžinami 660 in 720 nm prevladuje bledenje enofotonske absorpcije ( $TA > 0$ ), medtem ko absorpcijo prostih nosilcev naboja oz. inducirano absorpcijo ( $TA < 0$ ) najdemo pri krajših in daljših valovnih dolžinah, z maksimumom magnitude pri 730 nm. Takšen TA spekter pokaže tekmovanje med eno- in dvofotonsko absorpcijo (nad in pod robom prevodnega pasu, pri približno 730 nm) ter inducirano absorpcijo. Na sliki 10e

pa je prikazano, da pri velikih intenzitetah črpalnega žarka (nad 90 nW), tudi blizu roba prevodnega pasu, prevlada inducirana absorpcija. Nadalje krivulje na slikah 10c in 10f razkrivajo tekmovanje med bledenjem absorpcije in inducirano absorpcijo.

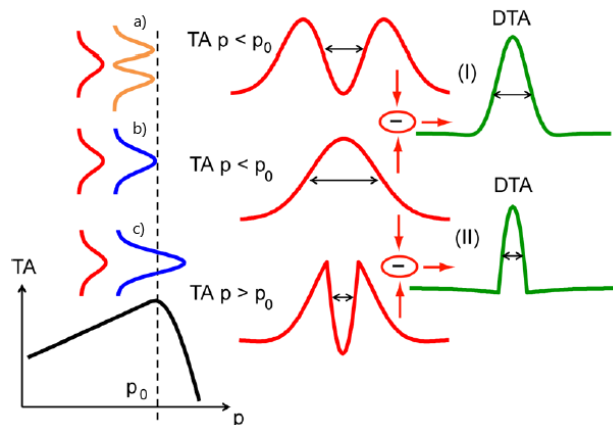
## 4.2 Opis eksperimenta

Na sliki 11 je prikazana postavitve DTA mikroskopa, kjer laser (TOPAS, LIBRA) generira vertikalno polariziran Gaussov žarek, ki ga najprej razdelimo na dva dela v razmerju 10:90 glede na intenziteto (BS1). Žarek z manjšo intenziteto je testni žarek (rdeča linija), žarek z večjo intenziteto pa dodatno razdelimo na dva črpalna žarka v razmerju 50:50 (BS2). Eden gre skozi  $2\pi$  fazno masko (VPP), da intenzitetni profil postane kolobarjaste oblike (oranžna linija). Poravnamo ga skupaj z drugim črpalnim žarkom, ki ostane Gaussov (modra linija), in po prehodu skozi  $\lambda/4$  fazno ploščico (WP2) postaneta oba žarka cirkularno polarizirana. Izmenično osvetlitev vzorca s črpalnima žarkoma realiziramo z diskom C1, ki se vrti s frekvenco  $f_1 = 500$  Hz. Disk C2, ki se vrti s frekvenco  $f_2 = 333$  Hz, pa modulira testni žarek, ki se mu po prehodu skozi  $\lambda/2$  fazno ploščico (WP1) polarizacija spremeni v horizontalno.

Vse tri žarke nato poravnamo in z močnim objektivom (OB) fokusiramo na vzorec, ki ga premikamo s piezoelektričnim skenerjem. Povratno sipano svetlobo usmerimo na detektor (fotodiodo). Dobljeni signal pošljemo na fazni detektor s frekvenco  $f_1 - f_2 = 167$  Hz, preko katerega dobimo TA in DTA signal. Pred fotodiodo sta postavljena  $\lambda/4$  fazna ploščica (WP3) in linearni polarizator (LP).  $\lambda/4$  ploščica spremeni polarizacijo testnega žarka v cirkularno in polarizacijo črpalnih žarkov v linearno, zato da polarizator blokira svetlobo črpalnih žarkov in do detektorja pride samo svetloba testnega žarka. S CCD kamero preverimo ali so žarki na vzorcu res poravnani, uporablja pa se tudi pri opazovanju vzorca z običajno optično mikroskopijo.



**Slika 11.** Postavitve DTA mikroskopa. Prirejeno po [13].



**Slika 12.** Linearni (I) in nelinearni (II) princip DTA mikroskopije. Rdeče krivulje predstavljajo testni žarek, modre Gaussov črpalni žarek in oranžne črpalni žarek oblike krožnega kolobarja (v skladu s sliko 11). Povzeto po [13].

Na sliki 12 sta prikazana dva različna načina DTA mikroskopije, kjer je DTA signal enak razliki TA signalov povzročenih z dvema črpalnima žarkoma. Testni žarek je vedno Gaussove oblike.

Pri prvem, linearnem načinu (slika 12(I)), sta oba črpalna žarka pod pragom nelinearnosti  $p_0$ , torej smo v območju linearne prehodne absorpcije TA. Ločljivost pod uklonsko limito dobimo tako, da kombiniramo črpalna žarka kolobarjaste (a) in Gaussove (b) oblike, analogno kot pri STA mikroskopiji. Oba TA signala sta pozitivna, če pa odštejemo signal kolobarjaste oblike od signala Gaussove

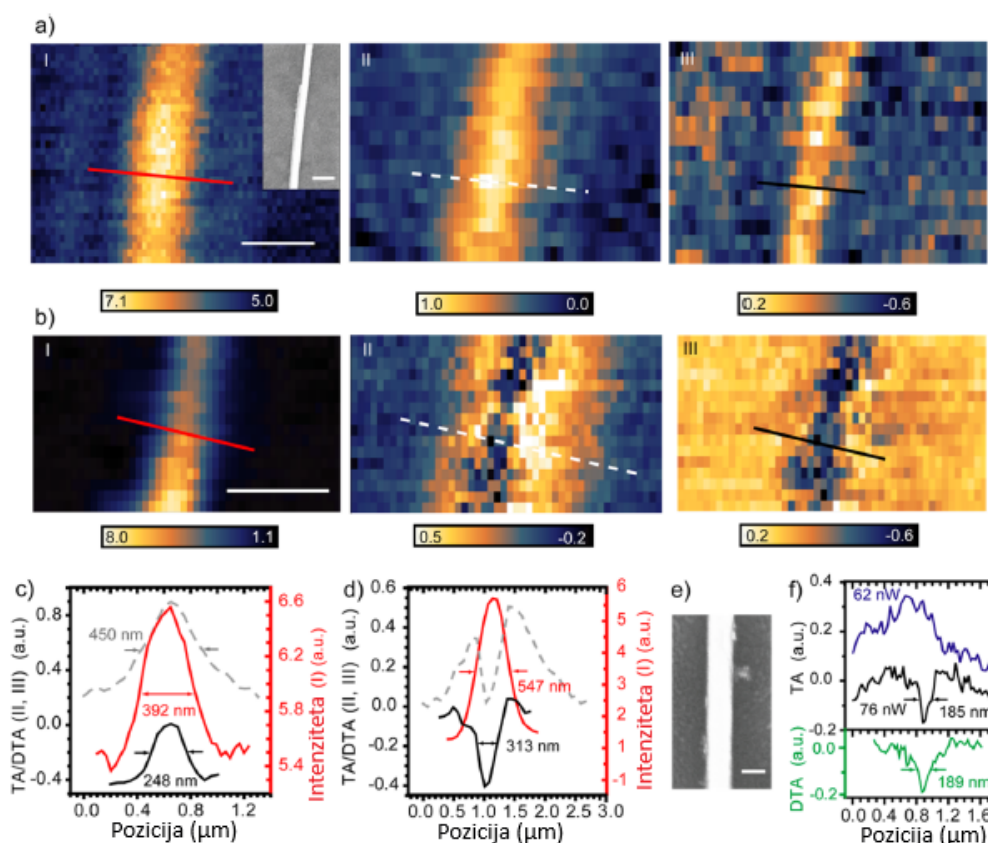
oblike, dobimo DTA signal (I), ki je ožji in višji od Gaussovega. Na robovih se namreč zmanjša, na sredini pa poveča. Ločljivost tako določa profil kolobarjastega žarka.

Pri drugem, nelinearnem načinu (slika 12(II)), kombiniramo dva Gaussova črpalna žarka, pri čemer ima prvi (b) intenziteto v linearnem območju absorpcije, drugi (c) pa v nelinearnem. V območju močnejšega žarka, ki je nad pragom nelinearnosti, naklon TA krivulje spremeni predznak (graf  $TA(p)$  na sliki 12). Osrednji del TA signala se tako "obrne navzdol". Ko odštejemo slednji signal od signala Gaussove oblike, dobimo DTA signal (II), ki je še ožji od prejšnjega, torej se je ločljivost še izboljšala.

### 4.3 Rezultati

Pri eksperimentu so opazovali nanodelce kadmijevega selenida (CdSe), nameščene na steklo v obliki trakov s širino 20-100 nm in dolžino 2-6  $\mu\text{m}$ , kar so za vsak opazovani nanotrak potrdili z elektronsko mikroskopijo (SEM). Vsak vzorec so najprej identificirali tudi z navadno optično mikroskopijo.

Nekaj rezultatov je bilo prikazanih že na sliki 10, vendar so tam uporabili samo en črpalni žarek, saj je bil namen prikazati odvisnost TA signala od različnih parametrov.



**Slika 13.** Slike pridobljene iz povratno sipane svetlobe (I), TA signala (II) in DTA signala (III). (a) Linearni način DTA mikroskopije, kjer je opazovan NB3 iz vstavljenе slike pri (a), posnete s SEM mikroskopijo (skala: 500nm). (b) Nelinearni način DTA mikroskopije, kjer je opazovan NB4 (skala: 1  $\mu\text{m}$ ). (c) Prezezi, pridobljeni iz (a). (d) Prezezi, pridobljeni iz (b). (e) SEM posnetek nanotraku NB5 (skala: 50 nm). (f) Prerez TA signalov NB5, pridobljenih z Gaussovima žarkoma. Z zeleno je prikazan DTA signal. Prirejeno po [13].

Na sliki 13 vidimo primerjavo med linearnim (13a (III)) in nelinearnim (13b (III)) načinom DTA mikroskopije.

Na sliki 13c lahko odčitamo širino CdSe nanotraku NB3 in primerjamo ločljivost posameznih tehnik v linearnem režimu prehodne absorpcije. Na sliki 13a (I), ki je bila pridobljena iz povratno sipane svetlobe, vidimo širino nanotraku kot  $392 \pm 10$  nm. Precej boljšo ločljivost nam da linearna DTA metoda (slika 13a (III)), kjer je širina nanotraku enaka  $248 \pm 10$  nm. Nanotrak NB3 so posneli tudi z elektronsko mikroskopijo (SEM) (vstavljena slika pri 13a (I)), kjer se je izkazalo, da je NB3 v resnici širok  $82 \pm 3$  nm. Izkaže se, da je eksperimentalna ločljivost linearnega načina DTA mikroskopije za tanke nanotrakove v povprečju enaka  $\frac{\lambda}{3.0NA}$ , kjer je  $\lambda$  valovna dolžina vpadne svetlobe in NA numerična apertura mikroskopa. To predstavlja precejšnjo izboljšavo v primerjavi z uklonsko limito, določeno z enačbo (4):  $\frac{1,22\lambda}{2.0NA}$ .

Na sliki 13d lahko odčitamo širino CdSe nanotraku NB4 in primerjamo ločljivost tehnik, kjer Gaussov črpalni žarek deluje v režimu nelinearne absorpcije. Na sliki 13b (I), ki je bila pridobljena iz povratno sipane svetlobe, vidimo širino nanotraku kot  $547 \pm 10$  nm. Pri DTA metodi (slika 13a (III)), kjer dodamo še drugi Gaussov žarek pod pragom nelinearnosti, pa dobimo, da je širina nanotraku NB4 enaka  $313 \pm 10$  nm. Na sliki 13b (II), ki je pridobljena iz TA signala, lahko opazimo, da se v sredini nanotraku pojavi temna linija. Na tem območju absorpcija pada, kar je posledica prehoda iz bledenja absorpcije na inducirano absorpcijo. Pogoj za to je dovolj velika moč Gaussovega črpalnega žarka, ki deluje v nelinearnem režimu prehodne absorpcije.

Rekordno eksperimentalno ločljivost  $\frac{\lambda}{4.1NA}$  so posneli pri CdSe nanotraku NB5 (sliki 13e in 13f), kjer je dejanska širina nanotraku, posneta z elektronsko mikroskopijo (SEM), enaka  $56 \pm 3$  nm, medtem ko z nelinearno DTA metodo dobimo širino  $185 \pm 10$  nm.

## 5. Zaključek

STED mikroskopija je zelo učinkovita metoda, ki z zmanjševanjem fluorescence s stimuliranim sevanjem omogoča super-ločljivo opazovanje materialov, označenih s fluorescenčnimi označevalci. To so precej velike molekule, ki se zlahka vežejo na biološke vzorce, zelo težko pa jih dodamo v strukturo trdnin. STED mikroskopija ima prostorsko ločljivost nekaj 10 nm, poročali pa so tudi že o ločljivosti nekaj nm.

Za proučevanje širšega nabora vzorcev lahko uporabimo absorpcijske spektroskopske tehnike, katerih ločljivost pa je omejena z uklonsko limito. Na podlagi ultra-hitre absorpcijske mikroskopije se je razvila STA metoda, ki temelji na nasičeni absorpciji. Princip delovanja je analogen STED mikroskopiji, zato je tudi ločljivost podobna. Vendar ima tudi STA mikroskopija omejitve. Nekateri materiali so sicer dobri nasičeni absorberji, pri večini pa dosežemo nasičenje šele pri zelo visoki intenziteti vpadne svetlobe, pogosto tik preden pride do optičnih poškodb materiala.

Da bi razširili uporabo super-ločljivih tehnik, ki temeljijo na prehodni absorpciji, so pred kratkim razvili nelinearno diferenčno absorpcijsko mikroskopijo. Ta metoda izkorišča nelinearnost absorpcije, vendar ne zahteva nasičenja le-te. Ločljivost okoli 100 nm doseže z izmeničnim osvetljevanjem vzorca z dvema črpalnima žarkoma. Ločimo lahko dva načina, pri prvem imamo Gaussov in kolobarjast žarek v režimu linearne absorpcije, pri drugem pa imamo dva Gaussova žarka, od katerih je eden pod, drugi pa ravno nad pragom nelinearnosti. Prednost te metode je, da zaradi nizke intenzitete ne poškodujemo vzorca, poleg tega pa je uporabna za preučevanje raznih vrst polprevodnikov in izolatorjev. Dandanes se pomen polprevodniških nanomaterialov močno povečuje, saj so uporabni na različnih tehniških področjih, na primer pri fotovoltaiki, nanomehaniki, optičnih laserjih in ojačevalcih ter integriranih elektronskih in fotonih vezjih. Nelinearno diferenčno absorpcijsko mikroskopijo tako lahko razumemo kot pomemben korak k razvoju hitre spektralne analize nanonaprav, ki materialov ne poškoduje.

LITERATURA

- [1] History of the microscope [online]. 2010. History-of-the-microscope.org, United Kingdom. [Obiskano 10. 4. 2018]. Dostopno na spletnem naslovu: (<http://www.history-of-the-microscope.org/history-of-the-microscope-who-invented-the-microscope.php>)
- [2] slika: Airy disk by Spencer Bliven, 2014. Wikipedija, the free encyclopedia. [Obiskano 21. 3. 2018]. Dostopno na spletnem naslovu: (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=31456019>)
- [3] slika: Confocal microscop. John Innes Centre. [Obiskano 11. 4. 2018]. Dostopno na spletnem naslovu: ([https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5\\_8.htm](https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_8.htm))
- [4] Konfokalni mikroskop [online]. 2016. Wikipedia, the free encyclopedia. [Obiskano 8. 3. 2018]. Dostopno na spletnem naslovu: ([https://sl.wikipedia.org/wiki/Konfokalni\\_mikroskop](https://sl.wikipedia.org/wiki/Konfokalni_mikroskop))
- [5] Mlinarič, N. STED Microscopy. Seminar I, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, 2016
- [6] Busko, D.; Balushev, S.; Crespy, D.; Turshatov, A.; Landfester, K. New possibilities for materials science with STED microscopy. *Micron*. 2012, vol. 43, 5, 583-588
- [7] slika: Intensity images. Ruhr-Universität Bochum. [Obiskano 11. 4. 2018]. Dostopno na spletnem naslovu: (<https://www.rubion.rub.de/en/methods/sted-super-resolution-fluorescence-recordings/>)
- [8] slika: STED principal. NKT Photonics. [Obiskano 11. 4. 2018]. Dostopno na spletnem naslovu: (<https://www.nktpotonics.com/lasers-fibers/application/sted-microscopy/>)
- [9] Transient-absorption spectroscopy [online]. 2018. Wikipedia, the free encyclopedia. [Obiskano 15. 3. 2018]. Dostopno na spletnem naslovu: ([https://en.wikipedia.org/wiki/Time-resolved\\_spectroscopy#Transient-absorption\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Time-resolved_spectroscopy#Transient-absorption_spectroscopy))
- [10] Berera, R.; van Grondelle, R.; Kennis, J. T. M. Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems. *Photosynthesis Res.* 2009, 101(2-3), 105-118
- [11] Wang, P.; Slipchenko, M. N.; Mitchell, J.; Yang, C.; Potma, E. O.; Xu, X. F.; Cheng, J.-X. Far-field imaging of non-fluorescent species with subdiffraction resolution. *Nat. Photonics*. 2013, 7, 449-453
- [12] Mur, J. Dvofotonski procesi. Seminar I, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, 2011
- [13] Liu, N.; Kumbham, M.; Pita, I.; Guo, Y.; Bianchini, P.; Diaspro, A.; Tofail, S. A. M.; Peremans, A.; Silien, C. Far-Field Subdiffraction Imaging of Semiconductors Using Nonlinear Transient Absorption Differential Microscopy. *ACS Photonics*. 2016, 3, 478-485