

ОБЩАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ  
ТЕХНИКА

УДК 53.086+53.082

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ ДВУХФОТОННЫЙ СКАНИРУЮЩИЙ  
МИКРОСКОП

© 2012 г. С. В. Семин, А. В. Кудрявцев, Е. Д. Мишина

Московский государственный технический университет радиотехники,  
электроники и автоматики

Россия, 119454, Москва, просп. Вернадского, 78

Поступила в редакцию 22.06.2011 г.

Разработан автоматизированный цифровой микроскоп для исследования микроструктур на длинах волн второй оптической гармоники и двухфотонной люминесценции. В отличие от коммерческих образцов, микроскоп позволяет исследовать зависимость изображений от угла падения и азимута, угла приема излучения, а также поляризационные характеристики в органических и неорганических структурах. В качестве примеров приведены результаты исследования нелинейно-оптических свойств пептидных трубок и микроструктур на основе оксида цинка.

ВВЕДЕНИЕ

Двухфотонная микроскопия является частным случаем многофотонной микроскопии и находит широкое применение при изучении различных физических и биологических явлений и объектов, как правило, в конфокальной геометрии. Этот метод диагностики включает в себя такие методики, как генерация второй оптической гармоники и двухфотонная люминесценция.

На сегодняшний день основное применение многофотонной конфокальной микроскопии — биология. Это связано с тем, что данная методика позволяет получать трехмерные изображения тканей за счет изменения фокусировки лазерного излучения [1], что оказывается возможным в связи с большой глубиной проникновения излучения на основной длине волны (700–1000 нм) в биологические ткани (биологическое окно прозрачности [2]).

Для исследования материалов методом двухфотонной микроскопии разработаны коммерческие образцы двухфотонных микроскопов. Такого рода приборы присутствуют в модельном ряду компаний, занимающихся изготовлением оптических микроскопов и комплектующих к ним, например Nikon (A1R MP), Olympus (FV1000 MPE), Carl Zeiss (LSM 510 NLO). Для исследования твердотельных микроструктур (для микроэлектроники) выпускаются конфокальные профилометры, однако эти приборы являются однофотонными и их функциональные возможности достаточно ограничены.

В исследовательских лабораториях двухфотонная микроскопия используется для получения изображения полупроводниковых и металлических наноструктур [3], а также доменной структуры [4, 5] в сегнетоэлектрических и мультиферро-

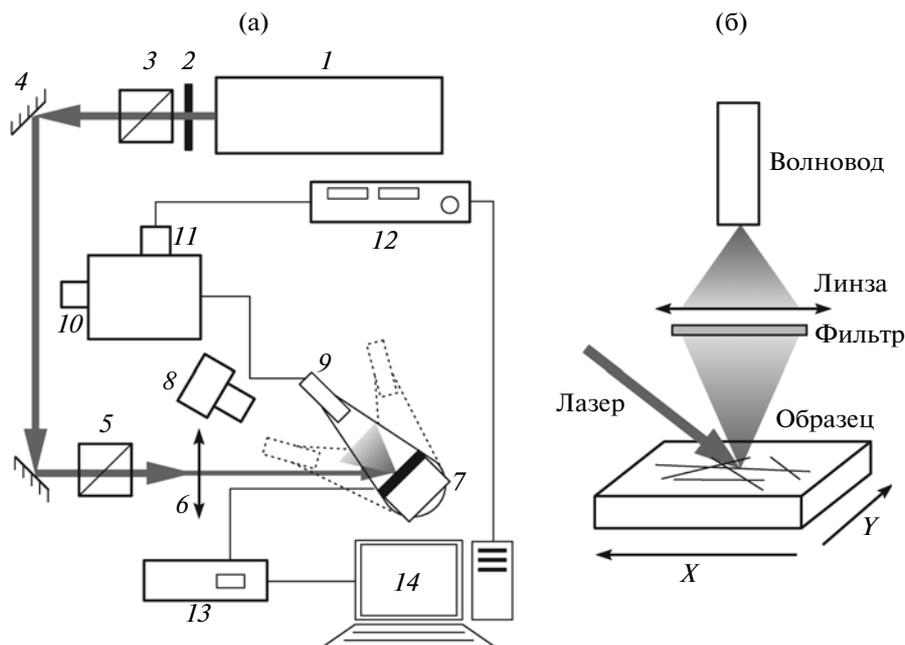
идных пленках. Очевидно, что для полноценного анализа параметров неорганических твердотельных структур возможностей микроскопов, ориентированных на биологические объекты, недостаточно. Это связано с особенностями генерации второй оптической гармоники и двухфотонной люминесценции в неорганических твердотельных микро- и наноструктурах.

Большое количество твердотельных наноструктур являются эпитаксиальными, т.е. в них сохраняются кристаллографические направления (в отличие от биологических объектов, которые, как правило, изотропны, хотя есть и исключения [6]). В свою очередь векторное поле второй гармоники определяется векторным полем накачки  $\mathbf{E}_\omega$  и тензором нелинейной восприимчивости второго порядка  $\hat{\chi}$ :

$$\mathbf{E}_{2\omega} \propto \hat{\chi} \mathbf{E}_\omega \mathbf{E}_\omega.$$

Данное выражение определяет векторное поле второй гармоники в простейшем случае нецентросимметричной среды. Однако в случае центросимметричных объектов, а также магнитных материалов выражения для поля второй гармоники более сложные [7]. При этом именно компоненты тензора  $\hat{\chi}$  несут информацию об особенностях твердотельных структур (это могут быть как абсолютные величины компонент тензора  $\hat{\chi}$ , так и их зависимости от приложенных внешних воздействий, например, электрического и магнитного полей) и определяют контраст нелинейно-оптического изображения.

Это означает, что особую важность приобретают поляризационные изображения, которые отличаются от случая однофотонного микроскопа. В последнем достаточно получить изображения при скрещенной и параллельной ориентациях



**Рис. 1.** Схемы: **а** – экспериментальной установки (1 – титан-сапфировый лазер; 2 – оптомеханический прерыватель; 3 – оптический изолятор; 4 – зеркало; 5 – полуволновая пластинка; 6 – фокусирующая линза; 7 – образец, закрепленный на двухкоординатной трансляционной платформе; 8 – камера с микроскопом; 9 – входная апертура детектора; 10 – выход монохроматора с п.з.с.-детектором; 11 – выход монохроматора с ф.э.у.; 12 – синхронный детектор; 13 – контроллер двухкоординатной трансляционной платформы; 14 – персональный компьютер); **б** – регистрации излучения от пептидных трубок.

поляризатора и анализатора. В случае двухфотонной микроскопии твердотельных кристаллических структур важную роль играет также ориентация векторов электрического поля накачки и второй оптической гармоники относительно кристаллографических осей нано- и микроструктур.

При исследовании микро- и наноструктур, формирующих упорядоченные массивы, необходимо иметь возможность изменять углы падения и регистрации излучения, поскольку такие структуры могут обладать запрещенной фотонной зоной, которая определяет возможные направления распространения света при отражении и пропускании света [8]. Однако и в случае неупорядоченных структур исследование угловых зависимостей может оказаться необходимым. При случайной ориентации нанокристаллитов возможно изменение характера пространственного распределения второй гармоники и двухфотонной люминесценции. Также при рассеянии света в массиве микро- и наноструктур (например, оксида цинка [9]) возможно формирование замкнутых траекторий света, что может привести к эффекту, называемому случайной лазерной генерацией. Формирование резонатора происходит случайным образом. Это приводит к тому, что результирующее лазерное излучение не имеет выделенного направления, поэтому для полноценного исследо-

вания случайной лазерной генерации необходимо исследование диаграмм рассеяния.

## ОПИСАНИЕ УСТАНОВКИ

Разработанная установка (рис. 1) предназначена для детектирования спектров излучения в видимой области спектра. В качестве источника лазерного излучения использовался фемтосекундный лазер на кристалле сапфира, допированного ионами титана, с частотой повторения импульсов 100 МГц и шириной импульсов не более 100 фс. Лазер позволяет автоматически перестраивать рабочую длину волны в диапазоне от 690 до 1040 нм. Средняя выходная мощность излучения составляет 1.6 Вт. Для модуляции, а также для предварительного снижения мощности падающего на образец излучения был использован оптико-механический прерыватель.

После лазера установлен оптический вентиль для предотвращения попадания лазерного излучения обратно в резонатор за счет отражения от оптических элементов. Контроль за ориентацией поляризации падающего излучения и мощностью излучения осуществляется с помощью последовательно стоящих друг за другом поляризатора и полуволновой пластинки.

Излучение фокусируется на образце линзой с фокусным расстоянием 3 см, закрепленной на

микрометрической подвижке. Линза изготовлена из стекла с градиентным показателем преломления. Такая конструкция линзы позволяет получить меньший диаметр лазерного пятна в перетяжке по сравнению с линзами, изготовленными из однородного стекла при аналогичных фокусных расстояниях. В описываемой экспериментальной установке диаметр пятна в перетяжке составляет 2 мкм. На рис. 16 представлена схема регистрации излучения от образца. Приемная система расположена перпендикулярно поверхности образца на трехкоординатной платформе, что позволяет точно позиционировать детектор. Исследуемый образец закреплен на трансляционной платформе, которая перемещает образец в вертикальном и горизонтальном направлениях с точностью до 500 нм, а также вращать образец относительно оси, перпендикулярной плоскости образца.

Излучение от образца проходит через фильтр BG-39 (Schott glass, область пропускания от 320 до 650 нм), чтобы отсеять излучение на основной частоте, затем короткофокусной линзой собирается на входной апертуре оптического волокна диаметром около 1 мм. Волокно представляет собой пучок из 19 волокон  $\varnothing 200$  мкм (245 мкм с оболочкой). На одном конце волокна волноводы формируют линейку, что позволяет снизить потери при сопряжении со щелью монохроматора. На другом конце волноводы формируют круг для лучшего сопряжения с собирающей линзой. Перед входной щелью установлен еще один фильтр BG-39.

Монохроматор за счет поворотного зеркала позволяет переключаться между п.з.с.-матрицей (для регистрации спектральных зависимостей) и фотоэлектронным умножителем (для регистрации сигнала на определенной длине волны). Монохроматор снабжен автоматизированной турелью, позволяющей программно менять дифракционные решетки. На турели установлены решетки 150, 300 и 600 штрихов/мм. Для снижения уровня шумов п.з.с.-матрица охлаждается жидким азотом до температуры  $-120^{\circ}\text{C}$ .

Сигнал от п.з.с.-детектора направляется на плату регистрации, подключенную к компьютеру. Сигнал, зарегистрированный фотоэлектронным умножителем (ф.э.у.), поступает на синхронный детектор, синхронизированный с оптико-механическим прерывателем. Ф.э.у. работает в режиме регистрации тока, однако для регистрации световых потоков низкой интенсивности возможна работа в режиме счета фотонов. Для этого в установку должны быть включены счетчик фотонов и предусилитель сигнала.

Сбор данных от синхронного детектора или счетчика фотонов осуществляется через интерфейс GPIB. Положение лазерного пятна на образце контролируется с помощью камеры с увеличи-

вающим объективом. Автоматизация экспериментальной установки осуществлена в программной среде LabView. Установка позволяет проводить сканирование поверхности образца и регистрацию в отдельной точке как спектров, так и излучения на отдельных длинах волн. Полученные экспериментальные данные могут дать представление о спектральном составе излучения в различных точках образца, а также свойствах кристаллической структуры материала. Программа позволяет управлять такими параметрами сканирования, как область сканирования, шаг сканирования и получать предварительные данные о топографии поверхности. Также она позволяет контролировать параметры лазера (длина волны, мощность накачки) и монохроматора. В частности, можно управлять шириной входной щели монохроматора, временем выдержки, сменой дифракционных решеток.

Для исследования угловых зависимостей люминесценции и второй гармоники (диаграмм направленности) возможна модификация установки. Двухкоординатная платформа устанавливается на поворотную платформу. Детектор располагается на выносной консоли, помещенной на вторую поворотную платформу. И детектор, и образец могут вращаться друг относительно друга независимо. Такая конструкция позволяет изменить положение детектора относительно точки поверхности образца.

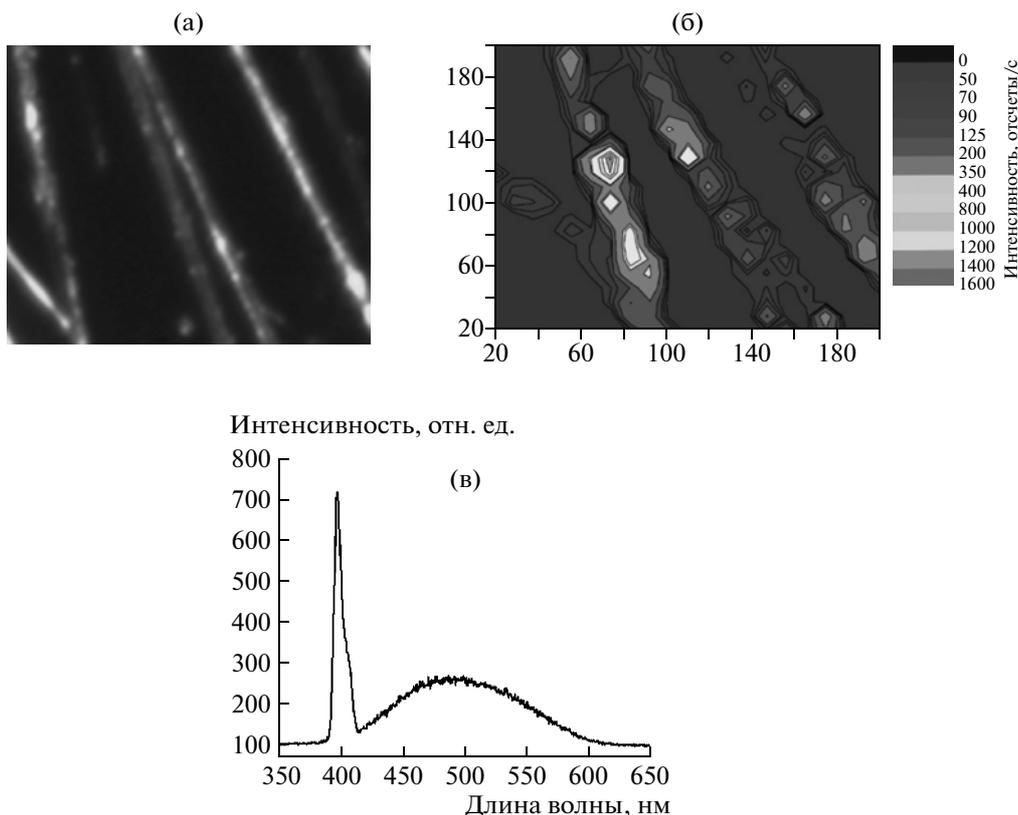
## ТЕСТОВЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Для тестовых измерений были использованы пептидные трубки на подложках из золота и кремния. Диаметр трубок составляет от сотен нанометров до десятков микрометров, длина может достигать до единиц миллиметров. Учитывая размер структур, при исследовании их оптических свойств необходимо убедиться, что во время эксперимента лазерное излучение попадает на конкретную трубку. Также важно знать, как меняется спектральный состав излучения вдоль единичной трубки.

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ КАРТИРОВАНИЕ

При изучении оптических свойств структур, имеющих размеры несколько микрометров, необходимо убедиться, что сигнал регистрируется непосредственно от исследуемого объекта, а не от подложки. В данной установке для этого можно провести сканирование поверхности. Проведя сравнение полученного изображения с изображением, полученным, например, методом оптической микроскопии, можно определить связан ли полученный сигнал с исследованными структурами.

На рис. 2 представлены изображения топографии пептидных трубок на подложке Au, получен-



**Рис. 2.** Исследование оптических свойств пептидных трубок на подложке Au: **а** — изображение, полученное с помощью оптического микроскопа; **б** — изображение, полученное с помощью сканирования лазерным лучом на длине волны второй гармоники (длина волны 400 нм, размер изображения  $200 \times 200$  мкм, шаг сканирования 10 мкм); **в** — спектр излучения при накачке 800 нм

ные с помощью автоматизированного двухфотонного сканирующего микроскопа и оптического микроскопа. На рис. 2а приведено оптическое изображение поверхности, на рис. 2б — изображение той же области, полученное методом сканирования.

Изображение было получено при средней мощности излучения 40 мВт, длина волны накачки составила 800 нм. Регистрация проводилась ф.э.у. на длине волны 400 нм, что соответствует длине волны второй гармоники. Область сканирования представляет собой квадрат со сторонами, равными 480 мкм, шаг сканирования составляет 10 мкм. Из полученных изображений можно оценить диаметр трубок, который в среднем составляет 20 мкм.

На рис. 2в приведен спектр, полученный с помощью экспериментальной установки. Пик в области 400 нм соответствует второй оптической гармонике. Широкий пик от 425 до 600 нм с максимумом в области 485–490 нм соответствует двухфотонной люминесценции. Из полученных результатов видно, что сигнал второй гармоники вдоль одной трубки меняется неоднородно.

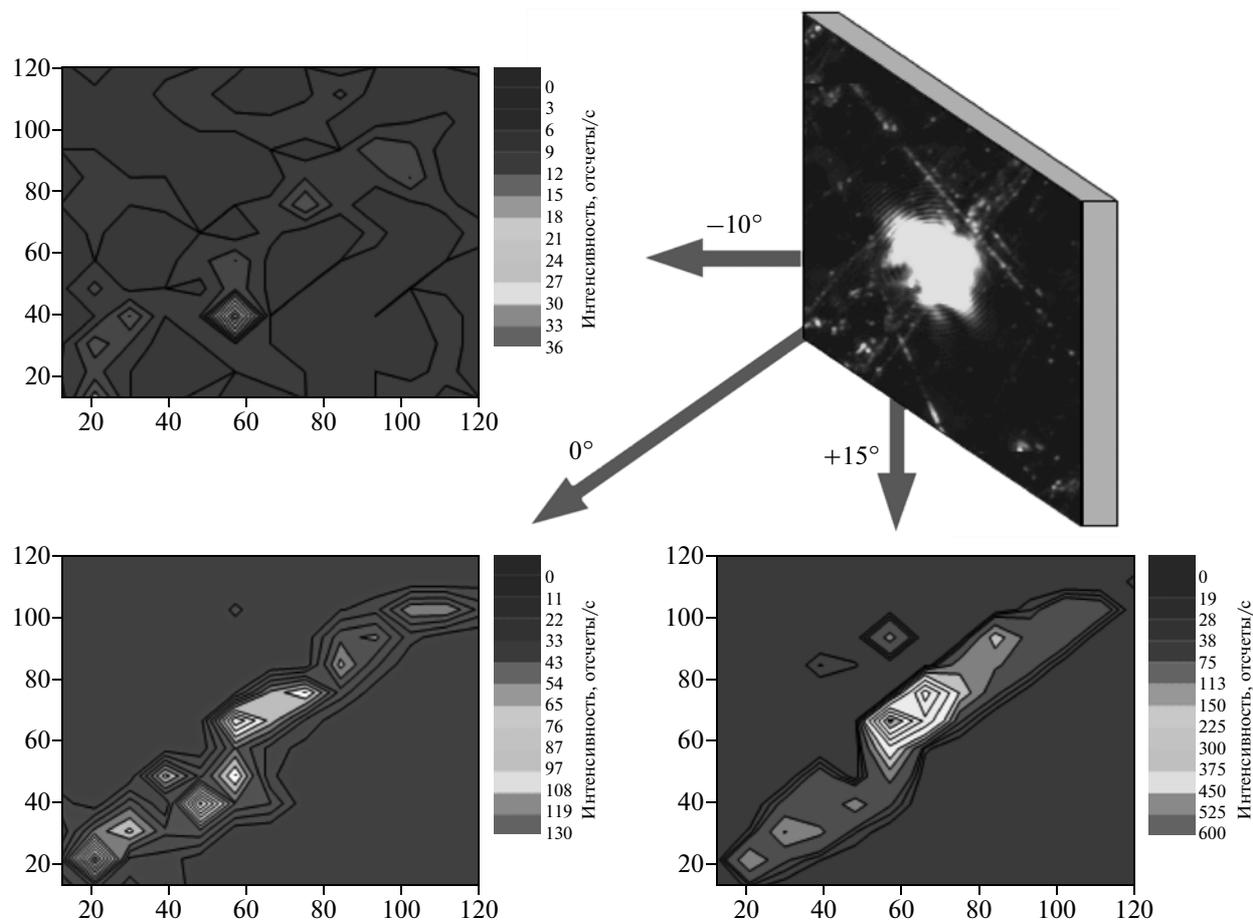
## УГЛОВЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

На рис. 3 представлены изображения трубки, полученные при различных углах детектирования сигнала второй гармоники. Размер изображений составляет  $120 \times 120$  мкм, шаг сканирования 10 мкм. Из рис. 3 видно, что для различных областей трубки существуют выделенные направления, вдоль которых трубка наиболее эффективно генерирует вторую гармонику.

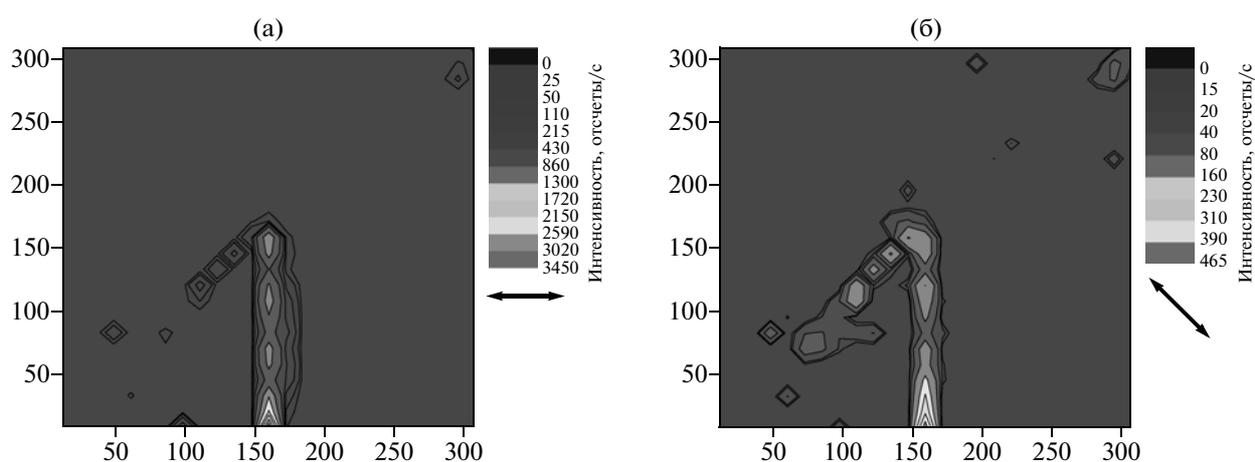
## ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Для получения полной информации о нелинейно-оптических свойствах кристаллических структур необходимо проведение поляризационных исследований. Из полученных экспериментальных данных можно определить тип кристаллической структуры исследуемого образца.

На рис. 4 представлены изображения трубки, измеренные при различных ориентациях падающего излучения: перпендикулярно вертикальной трубке (рис. 4а) и под углом  $45^\circ$  (рис. 4б). Изменение поляризации приводит к тому, что трубка, относительно которой направление поляризации перпендикулярно, видна лучше. Для получения



**Рис. 3.** Изображения трубки, зарегистрированные при различных углах детектирования ( $-10^\circ$ ,  $0^\circ$  и  $+15^\circ$ ). При  $0^\circ$  оптическая ось детектора перпендикулярна поверхности образца. Размер изображений  $120 \times 120$  мкм, сканирование проведено с шагом 10 мкм.



**Рис. 4.** Изображения трубки, полученные при различных ориентациях поляризации падающего лазерного излучения: **а** – поляризация перпендикулярна вертикальной трубке; **б** – поляризация ориентирована под углом  $45^\circ$ . Размер изображений  $300 \times 300$  мкм.

Сравнение характеристик разработанной установки с коммерческими образцами (источником излучения для всех установок служит титан-сапфировый лазер)

Характеристики	Разработанная установка	Nikon (A1R MP)	Olympus (FV1000 MPE)	Carl Zeiss (LSM 510 NLO)
Скорость сканирования	Единицы минут (15 × 15 пикселей)	Единицы секунд (512 × 512 пикселей)	Единицы секунд (256 × 256 пикселей)	Единицы секунд
Разрешение (зависит от объектива), мкм	2	0.4–0.8 (0.3)	0.4–0.8 (0.3)	0.4–0.8 (0.3)
Диапазон изменения угла детектирования (от нормали к поверхности)	от –50 до 50°	Недоступно	Недоступно	Недоступно
Область сканирования: диагональ, мм	21	18	Нет информации	Нет информации
Детектор	ф.э.у., п.з.с.	ф.э.у.	ф.э.у.	ф.э.у.
Детектируемый диапазон длин волн, нм	300–1000	400–750	400–750	400–750
Возможность измерения анизотропии оптических свойств	Есть	Нет	Нет	Нет

изображения, полностью соответствующего реальному расположению трубок на поверхности подложки, необходимо проводить сканирование при различных ориентациях поляризации падающего излучения.

### СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЗАВИСИМОСТИ

В качестве второго тестового образца был использован массив стержней оксида цинка. Диаметр отдельных стержней варьируется от единиц до десятков микрометров. На рис. 5а представлена схема сбора излучения от образца. Излучение лазера фокусировалось на боковой части массива из микротрубок, люминесценция детектировалась с торцевой части образца. При исследовании таких структур сканирование использовалось для того, чтобы определить положение образца, при котором интенсивность люминесценции будет максимальной. На рис. 5б представлены спектры излучения, полученные при сканировании образца. Как видно из экспериментальных данных, наблюдается изменение положения максимумов спектральных зависимостей, а также интенсивности сигнала при изменении положения образца относительно детектора.

### СРАВНЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗРАБОТАННОЙ УСТАНОВКИ С КОММЕРЧЕСКИМИ ПРИБОРАМИ

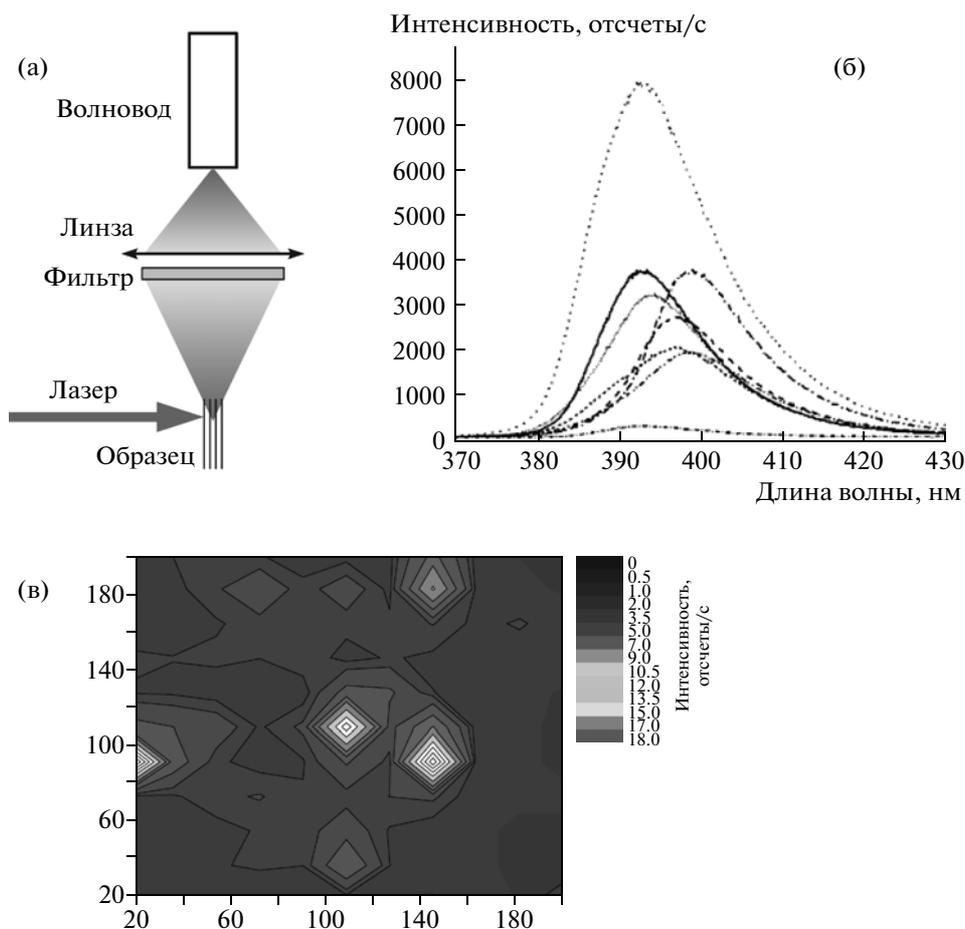
Полученные экспериментальные данные позволяют сравнить разработанную установку с коммерчески доступными приборами (см. таблицу). Эти приборы позволяют получать изображения биологических объектов с высокой скоростью и

большим разрешением (эта характеристика зависит от числовой апертуры объектива и от рабочей длины волны). Установка, несмотря на малую скорость сканирования и невысокое разрешение по сравнению с коммерчески доступными двухфотонными микроскопами, позволяет проводить ряд исследований, недоступных коммерческим приборам.

Конфокальная конфигурация, которая лежит в основе коммерческих приборов, предполагает расположение объектива на расстояниях в сотни микрометров от образца, что ограничивает функциональные возможности прибора. Это приводит к тому, что отсутствует, например, возможность изменения угла регистрации сигнала. В экспериментальной установке имеется фокусирующая линза с рабочим расстоянием 3 см, что совместно с поворотными платформами, на которых закреплены образец и детектор, позволяет проводить измерения угловых зависимостей излучения. Присутствие в конструкции разработанного прибора спектрометра дает возможность исследовать спектральный состав излучения в каждой точке образца, а наличие в установке поворотной платформы для образца – проводить исследования анизотропных характеристик кристаллических образцов методом генерации второй оптической гармоники.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Автоматизированная установка позволяет проводить сканирование поверхности и регистрировать излучение на определенной длине волны с помощью ф.э.у. Также возможно сканирование с



**Рис. 5.** Исследование оксида цинка: **а** – схема сбора излучения от оксида цинка; **б** – спектр люминесценции микро-трубок оксида цинка; **в** – топография оксида цинка (размер изображения  $200 \times 200$  мкм, сканирование проведено с шагом 20 мкм).

регистрацией спектрального состава излучения в отдельной точке с помощью п.з.с.-матрицы. С помощью данной установки проведены исследования нелинейно-оптических и спектральных свойств пептидных трубок и микро-трубок на основе оксида цинка. Для пептидных трубок наблюдается корреляция между оптическим изображением и изображением, полученным с помощью сканирования на длине волны второй оптической гармоники. Исследованы угловые зависимости генерации второй оптической гармоники. Измерены спектры излучения от пептидных трубок. Для образцов микро-трубок оксида цинка получены спектральные зависимости для различных областей образца.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Аналитическая ведомственная целевая программа “Развитие научного потенциала высшей школы”, Федеральная целевая программа “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России”), а также Российского фонда фундаментальных исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Denk W., Strickler J.H., Webb W.W.* // Science. 1990. V. 248. P. 73.
2. *Tromberg B.J., Shah N., Lanning R. et al.* // Neoplasia. 2000. V. 2(1–2). P. 26.
3. *Shuhua Yue, Slipchenko M.N., Ji-Xin Cheng* // Laser Photonics Rev. 2011. V. 5. № 4. P. 496.
4. *Kirilyuk V., Kirilyuk A., Rasing Th.* // Appl. Phys. Lett. 1997. V. 70. Issue 17. P. 2306.
5. *Lottermoser Th., Meier D., Pisarev R.V., Fiebig M.* // Phys. Rev. B. 2009. V. 80. 100101(R).
6. *Vidal Benedicto de Campos, Mello Maria Luiza S.* // Acta histochemica. 2010. V. 112. P. 53.
7. *Fiebig M., Pavlov V.V., Pisarev R.V.* // JOSA B. 2005. V. 22. Issue 1. P. 96.
8. *Joannopoulos J.D., Meade R.D., Winn J.N.* Photonic Crystals. Princeton University Press (NJ), 1995.
9. *Fallert J., Dietz R.J.B., Hauser M. et al.* // J. Luminescence. 2009. V. 129. Issue 12. P. 1685.