

Трёхмерная флуоресцентная наноскопия одиночных квантовых излучателей на основе оптики спиральных пучков света

И.Ю. Ерёмчев, Д.В. Прокопова, Н.Н. Лосевский,
И.Т. Мынжасаров, С.П. Котова, А.В. Наумов

Флуоресцентная дальнеполевая микроскопия сверхвысокого пространственного разрешения (наноскопия), отмеченная Нобелевской премией по химии в 2014 г., стала одним из наиболее востребованных инструментов в мультидисциплинарных приложениях фотоники. Рассмотрена техника трёхмерной наноскопии с детектированием трансформированных флуоресцентных изображений одиночных квантовых излучателей (на примере полупроводниковых коллоидных квантовых точек, КТ). Нанометровое пространственное разрешение при восстановлении всех трёх координат одиночных КТ достигается за счёт аппаратной модификации функции рассеяния точки с использованием высокоэффективных фазовых пространственных преобразователей светового поля (дифракционных оптических элементов, ДОЭ). Фазовые распределения ДОЭ, обеспечивающие формирование двухлепестковых световых полей с вращением распределения интенсивности при распространении, получены на основе оптики спиральных пучков света. Обсуждается вопрос о расчёте ДОЭ, обеспечивающих наилучшую эффективность преобразования световых пучков. Проведён теоретический и экспериментальный анализ точности метода в зависимости от экспериментальных параметров: интенсивности фотолюминесценции КТ, времени накопления сигнала, плотности мощности возбуждающего лазерного излучения, аппаратной функции объектива микроскопа. Показано, что для исследованных КТ CdSeS/ZnS точность определения координат может достигать значений ~ 10 нм при экспозиции ~ 100 мс.

Ключевые слова: люминесценция, микроскопия, наноскопия, дифракционный предел, пространственное разрешение, одиночная молекула, квантовая точка, функция рассеяния точки, адаптивная оптика, дифракционный оптический элемент, моды Лагерра–Гаусса, спиральные пучки, биспиральная функция рассеяния точки, DHSPSF, квантовая оптика, нанодиагностика, сенсорика

PACS numbers: 42.79. – e, 78.55. – m, 78.67.Hc

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2021.05.038982>

Содержание

1. Введение (663).
2. Модификация функции рассеяния точки по биспиральной схеме: техника эксперимента с использованием адаптивной оптики (664).
 - 2.1. Описание экспериментальной установки.
 - 2.2. Объекты исследова-

И.Ю. Ерёмчев^(1,2,a), Д.В. Прокопова⁽³⁾, Н.Н. Лосевский⁽³⁾,
И.Т. Мынжасаров^(2,4), С.П. Котова^(3,b), А.В. Наумов^(1,2,4,5,c)

⁽¹⁾ Институт спектроскопии РАН,
ул. Физическая 5, 108840 Троицк, Москва, Российская Федерация

⁽²⁾ Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН,
Троицкое обособленное подразделение,

ул. Физическая 11, 108840 Троицк, Москва, Российская Федерация
⁽³⁾ Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Самарский филиал,
ул. Ново-Садовая 221, 443011 Самара, Российская Федерация

⁽⁴⁾ Московский физико-технический институт,
(национальный исследовательский университет),
Институтский пер. 9, 141701 Долгопрудный, Московская обл.,
Российская Федерация

⁽⁵⁾ Московский педагогический государственный университет,
ул. Малая Пироговская 1, 119991 Москва, Российская Федерация
E-mail: ^(a) eremchev@isan.troitsk.ru, ^(b) kotova@fian.smr.ru,

^(c) a_v_naumov@mail.ru

Статья поступила 10 марта 2021 г.

дования и пробоподготовка. 2.3. Расчёт дифракционного оптического элемента.

3. Результаты эксперимента и обсуждение (666).

3.1. Аппаратная функция микрообъектива. 3.2. Калибровка биспиральной схемы с различными дифракционными оптическими элементами. 3.3. Точность восстановления пространственных координат точечных излучателей в зависимости от различных факторов. 3.4. 3D-наноскопия одиночных коллоидных полупроводниковых квантовых точек, проявляющих эффект мерцания люминесценции.

4. Заключение (672).

Список литературы (672).

1. Введение

Флуоресцентная наноскопия (оптическая микроскопия сверхвысокого пространственного разрешения) с локализацией одиночных маркерных молекул (Single Molecule Localization Microscopy, SMLM) является относительно новым методом характеристики и диагностики конденсированных сред и биообъектов. Высокая междисциплинарная и практическая значимость данного направления была подтверждена присуждением за эти исследования Нобелевской премии по химии в 2014 г.

© И.Ю. Ерёмчев, Д.В. Прокопова, Н.Н. Лосевский,
И.Т. Мынжасаров, С.П. Котова, А.В. Наумов 2022

(вместе с ещё одной методикой дальнеполевой микроскопии сверхвысокого разрешения на основе стимулированного избирательного тушения флуоресценции) [1–3]. Разрешение SMLM превосходит предел дифракции, которым ограничена классическая оптическая микроскопия, и позволяет определять положение одиночных точечных (квантовых) излучателей с точностью до единиц нанометров. К настоящему времени техника реализована как при комнатной, так и при криогенных температурах, что открыло принципиально новые возможности для биологических исследований [4], для физики конденсированных сред [5] и молекулярной спектроскопии [6].

Одним из прорывных результатов в развитии SMLM стали методы восстановления всех трёх координат точечного источника света. Наибольшее распространение в развитии методов трёхмерной (3D) наноскопии получила идея модификации функции рассеяния точки (Point Spread Function, PSF) оптической системы микроскопа таким образом, что изменение в структуре формируемого изображения можно однозначно связать с продольным положением источника (глубиной залегания по отношению к фокальной плоскости объектива микроскопа). Существуют различные подходы к модификации PSF микроскопа. Так, весьма простая (астигматическая) техника может быть реализована добавлением цилиндрической линзы в оптическую систему микроскопа [7]. В последние годы с развитием адаптивной оптики большие инструментальные возможности получила оптическая микроскопия [8, 9]. Использование фазопреобразующих пространственных модуляторов световых полей позволяет трансформировать PSF заданным образом, для чего активно развиваются численные методы расчёта соответствующих дифракционных оптических элементов (ДОЭ) путём поиска оптимальной суперпозиции мод Лагерра–Гаусса [10–15]. Этот подход является простым с точки зрения анализа полученных изображений и обладает довольно большой глубиной локализации объектов с сохранением точности восстановления координат.

В 2008 г. Pavanì и Piestun в работе [12] развили оригинальную технику преобразования PSF в двухлепестковое изображение, вращающееся при изменении расстояния между образцом и объективом (т.е. при изменении глубины залегания источника по отношению к фокальной плоскости микроскопа). В основу техники, получившей название биспиральной функции рассеяния точки (Double Helix Point Spread Function, DHPSF), были положены методы анализа и синтеза когерентных световых полей, успешно развиваемые российскими научными школами в Самарском филиале ФИАН им. П.Н. Лебедева РАН и Институте систем обработки изображений РАН (в настоящее время Самарский филиал ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН) [10, 11, 13, 15].

В 2009 г. техника DHPSF впервые была апробирована в эксперименте по визуализации флуоресцентных изображений одиночных молекул [16], что положило начало направлению трёхмерной флуоресцентной DHPSF-наноскопии. К настоящему времени методика продемонстрировала высокий потенциал для восстановления трёхмерной структуры объектов с нанометровым пространственным разрешением как при комнатной температуре для биофизических приложений [17], так и при криогенных

температурах при регистрации одиночных молекул в твёрдых матрицах [5].

Активное развитие DHPSF-наноскопии в настоящее время происходит по нескольким направлениям. Во-первых, необходимо разрабатывать методы расчёта ДОЭ с оптимальными параметрами, такими как эффективность преобразования световых полей, рабочий диапазон ДОЭ, а также с учётом характеристик оптических элементов микроскопа [15]. Во-вторых, задача распознавания изображений требует разработки специальных алгоритмов и программного обеспечения для обработки больших массивов информации [18, 19], в том числе с использованием алгоритмов машинного обучения [20]. Наконец, расширяется круг излучающих нанообъектов, исследование которых требует привлечения инструментальных возможностей 3D-наноскопии. Так, среди различных наноизлучателей, представляющих в настоящее время большой интерес для науки и технологий, особое место занимают низкоразмерные полупроводниковые структуры — квантовые ямы, нити, точки [21–23]. Спектроскопия и микроскопия одиночных квантовых точек (КТ) в различных средах зачастую требуют прецизионной пространственной локализации [24], в связи с чем для применения техники DHPSF к таким объектам необходима тщательная экспериментальная проверка.

В настоящей работе рассмотрены теоретические и экспериментальные основы техники DHPSF-наноскопии; приведены результаты компьютерных расчётов оригинальных фазовых дифракционных оптических элементов на основе двухлепестковых спиральных пучков, в том числе полученных с учётом аппаратной функции объектива микроскопа; проведены эксперименты по 3D-наноскопии одиночных коллоидных КТ CdSeS/ZnS; детально обсуждаются вопросы точности трёхмерной локализации таких квантовых излучателей.

2. Модификация функции рассеяния точки по биспиральной схеме: техника эксперимента с использованием адаптивной оптики

2.1. Описание экспериментальной установки

Установка представляет собой самодельный люминесцентный микроскоп, оптимизированный для проведения экспериментов по трёхмерной локализационной микроскопии с одиночными излучающими объектами: одиночными молекулами, квантовыми точками, центрами окраски в алмазах [25]. Главное отличие используемой экспериментальной установки от обычного люминесцентного микроскопа заключается в наличии дополнительного ДОЭ в оптической схеме регистрации микроскопа (рис. 1). Данный элемент проводит преобразование световых пучков, формируемых объективом микроскопа для каждого из "точечных" источников, в световые поля с двумя выделенными максимумами интенсивности (так называемые двухлепестковые поля), поворачивающимися в поперечной плоскости при распространении (вставка на рис. 1, см. также далее рис. 3). Полный поворот светового поля происходит на угол, определяемый параметром вращения спирального пучка света, используемого в качестве начального приближения при расчёте ДОЭ θ_0 . В данной работе исследовались ДОЭ, полученные на основе спирального пучка с параметром вращения $\theta_0 = -2$ (полный поворот на 180°). Поворот двухле-

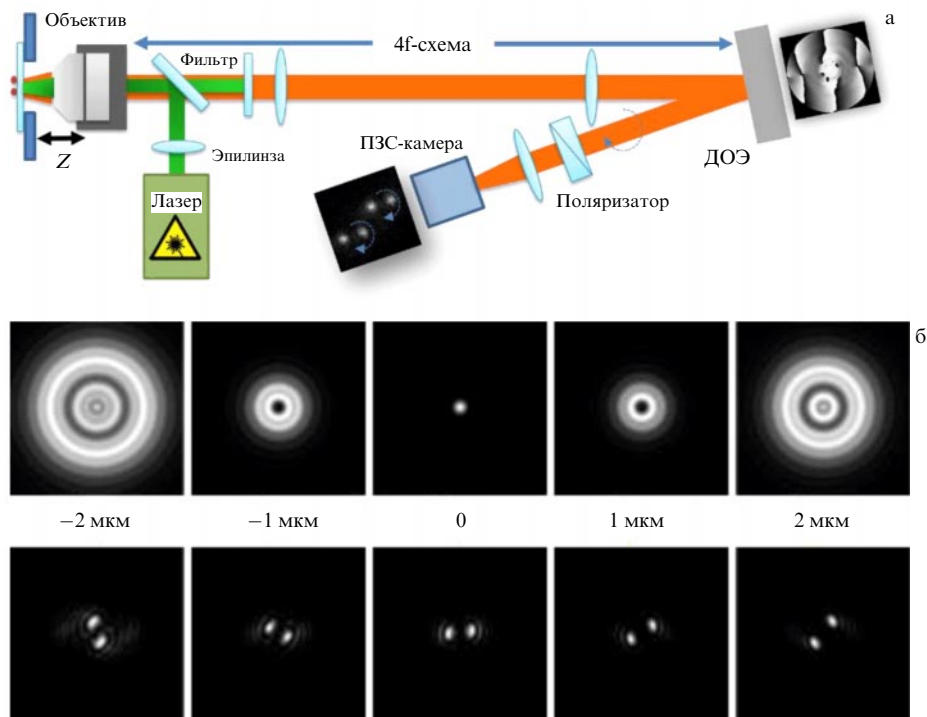


Рис. 1. (а) Принципиальная схема установки — люминесцентного 3D-наноскопа с инструментальной модификацией аппаратной функции рассеяния точки по биспиральной схеме. (б) Рассчитанные изображения идеального точечного источника излучения при пяти различных расстояниях по отношению к фокальной плоскости микрообъектива (от -2 до 2 мкм) при регистрации в схеме обычного микроскопа (верхний ряд изображений) и соответствующие двухлепестковые изображения при модификации функции рассеяния точки по биспиральной схеме (нижний ряд изображений).

песткового поля ($\Delta\alpha$) происходит главным образом вблизи фокальной плоскости изображения на характерном расстоянии порядка величины длины Рэлея (Z_R). При фиксированном положении плоскости регистрации двухлепестковое изображение имеет определённый угол поворота (как показано на рис. 1). При перемещении точечного объекта вблизи фокальной плоскости объектива микроскопа угол изменяется, поскольку происходит смещение плоскости изображения относительно плоскости регистрации. Это и позволяет определять продольную координату точечного объекта в трёхмерной наноскопии. Скорость вращения светового поля $1/k' = d\alpha/dz$, определяемая как приращение угла ($d\alpha$) к приращению расстояния (dz) вдоль оптической оси вблизи плоскости изображения, зависит от длины Рэлея Z_R и параметра вращения n . Тогда на линейном участке скорость вращения может быть выражена следующим образом: $1/k' = \Delta\alpha/Z_R = 4(NA)^2\Delta\alpha/\pi\lambda M^2$, где λ — длина волны, NA — числовая апертура оптической системы (объектива микроскопа), M — поперечное увеличение микроскопа, $\Delta\alpha$ — величина угла полного поворота на длине Рэлея. Продольное перемещение точечного объекта вблизи фокальной плоскости Z связано с продольным перемещением изображения z через продольное увеличение микроскопа, $z = ZM^2$, поэтому скорость вращения изображения $1/k = d\alpha/dZ = (d\alpha/dz)M^2 = 4(NA)^2\Delta\alpha/\pi\lambda$. В дальнейшем мы будем пользоваться именно этой скоростью и её обратной величиной k , поскольку она связывает угол поворота изображения с расстоянием между фокальной плоскостью объектива микроскопа и точечным объектом и непосредственно измеряется в эксперименте. Видно, что данная скорость зависит от числовой апертуры микрообъектива, длины волны, ве-

личины угла полного поворота на длине Рэлея, но не зависит от увеличения микроскопа.

Для преобразования световых пучков использовался пространственный жидкокристаллический фазовый модулятор Holoeye Pluto VB, позволяющий варьировать набег фазы линейно поляризованного света независимо для каждого из 1920×1080 пикселей (размером 8 мкм) жидкокристаллической матрицы. Необходимое для освещения модулятора состояние поляризации обеспечивалось с помощью линейного поляризатора (Thorlabs, США).

Изображение в микроскопе формировалось иммерсионным микрообъективом Carl Zeiss ($100\times$, $1,3NA$) и системой линз, состоящей из 4f-схемы и объектива ПЗС-камеры, что суммарно давало 93-кратное оптическое увеличение. Разрешение микроскопа (поперечное) составляло порядка 240 нм на длине волны люминесценции КТ (630 нм). Фазовый модулятор помещался в фокальную плоскость 4f-схемы микроскопа, сопряжённую с выходным зрачком микрообъектива. Геометрия оптической схемы микроскопа была оптимизирована таким образом, чтобы минимизировать угол падения пучков на фазовый модулятор для уменьшения ошибок, связанных с пространственным преобразованием фазы падающих пучков. Для точного изменения расстояния между фокальной плоскостью микрообъектива и образцом использовался пьезосканер (NanoScanTech), позволяющий перемещать микрообъектив с нанометровой точностью в направлении оптической оси. Калибровка ёмкостных датчиков перемещения пьезосканера осуществлялась с помощью высокоточного электронного микрометра Mahr Extramess 2000 (цена деления $0,2$ мкм, предел допускаемой погрешности $0,3$ мкм).

Возбуждение КТ осуществлялось перестраиваемым по длине волны лазером на красителе Coherent CR 599 на длине волны 580 нм. Плотность мощности возбуждающего излучения в плоскости образца варьировалась в диапазоне от 50 до 200 Вт см⁻². Кроме того, в ряде экспериментов использовался фемтосекундный лазер Avesta, Topol: вторая гармоника от холостого сигнала параметрического резонатора на длине волны 580 нм, частота повторения 1 МГц (прореженная с помощью электрооптического модулятора света), длительность лазерного импульса ~ 1 пс, плотность энергии в импульсе от 10 до 280 мкВт см⁻².

Люминесцентные изображения квантовых точек регистрировались с помощью высокочувствительной охлаждаемой ПЗС-камеры Andor Luca. Измерение люминесцентных траекторий проводилось с помощью лавинного фотодиода, работающего в режиме счёта отдельных фотонов EG&G SPCM 200 PQ. Время экспозиции одного кадра камеры для регистрации двухлепестковых изображений одиночных КТ варьировалось от 100 до 500 мс и от 10 до 400 мс для "точечных" агломераций КТ. Для устранения рассеянного лазерного излучения использовались полосовые интерференционные фильтры (Semrock).

2.2. Объекты исследования и пробоподготовка

Для демонстрации возможностей техники 3D-DHPSF-наноскопии в данной работе использовались полупроводниковые люминесцирующие нанокристаллы — коллоидные КТ оболочечного типа CdSeS/ZnS (Sigma Aldrich) с максимумом люминесценции на длине волны 630 нм. Отдельные КТ были нанесены на слаболюминесцирующую тонкую стеклянную подложку. Поверхностная концентрация подбиралась таким образом, чтобы изображения одиночных КТ не перекрывались в микроскопе (менее 1 КТ на 1 мкм²). В то же время на данном образце можно было найти участки, содержащие "точечные" агломерации (с размерами меньше дифракционного предела), состоящие из большого числа КТ. Такие объекты были также интересны для данного исследования, поскольку они выступали в качестве модели фотостабильного "точечного" излучающего объекта с интенсивностью, в несколько раз превышающей интенсивность люминесценции одиночных КТ в ярком состоянии. Для приготовления образцов использовался самодельный спинкоутер (горизонтальная центрифуга): на раскрученную стеклянную подложку помещалась капля коллоидного раствора КТ в толуоле, в результате чего КТ распределялись по пластине. Поверхностная концентрация варьировалась с помощью изменения концентрации КТ в растворе.

2.3. Расчёт дифракционного оптического элемента

Для создания ДОЭ, формирующего вращающееся изображение, удобно обратиться к световым полям, обладающим таким свойством. Отличительная черта спиральных пучков — вращение распределения интенсивности при распространении. Среди всего многообразия спиральных пучков света для решения поставленной задачи потребуются пучки, в распределении интенсивности которых можно выделить два главных максимума — двухлепестковые спиральные пучки [11, 13, 26]. Поскольку методы формирования спиральных пучков обладают низкой энергетической эффективностью, для модернизации PSF микроскопической системы используется ДОЭ,

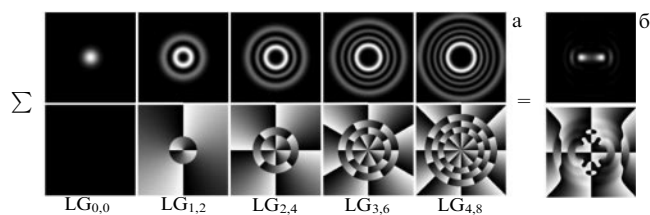


Рис. 2. (а) Пять мод Лагерра–Гаусса ($LG_{0,0}$, $LG_{1,2}$, $LG_{2,4}$, $LG_{3,6}$, $LG_{4,8}$), используемых в качестве начального приближения при расчёте ДОЭ для преобразования функции рассеяния точки по биспиральной схеме. (б) Суперпозиция указанных пяти мод Лагерра–Гаусса, составляющих биспиральный пучок. (Верхний ряд — распределения интенсивности в градациях серого цвета, нижний — соответствующие фазовые пространственные распределения для преобразующего ДОЭ.)

полученный на основе двухлепесткового спирального пучка, эффективно преобразующий падающий на него световой пучок в двухлепестковое световое поле (рис. 2).

Процедура расчёта элемента представляет собой модифицированный алгоритм Герчберга–Секстона, в котором коррекция поля происходит не только в одной фурье-плоскости, но и в нескольких плоскостях, равноотстоящих от неё. Это обеспечивает расчёт фазы элемента, формирующего заданную пространственную структуру поля. Подробно предложенный алгоритм описан в работе [27]. Одна итерация алгоритма представляет собой проведение прямых и обратных преобразований Френеля между N опорными плоскостями, в которых происходит корректировка распределения интенсивности поля. В качестве начального приближения использовалось фазовое распределение двухлепесткового спирального пучка света, представляющего собой суперпозицию пяти мод Лагерра–Гаусса,

$$F = LG_{0,0} + LG_{1,2} + LG_{2,4} + LG_{3,6} + LG_{4,8},$$

и однородное по апертуре элемента распределение интенсивности (см. рис. 2).

Ранее в ходе проведения исследований было обнаружено, что амплитудные и фазовые искажения существенно влияют на формируемое полученным элементом поле, вносят шумы в регистрируемое двухлепестковое изображение [28, 29]. Это в свою очередь может привести к ошибке локализации излучающего объекта. Поэтому с целью оптимизации рассчитываемого ДОЭ под работу с определённым объективом микроскопа в качестве начального приближения для интенсивности используется картина, формируемая объективом в фурье-плоскости, где будет располагаться элемент (рис. 3). В ходе такой оптимизации был рассчитан ДОЭ для работы с иммерсионным объективом Carl Zeiss (100×, 1,3NA), эффективность преобразования падающего излучения в двухлепестковое поле этого элемента составляет 86% и превосходит аналогичные значения для полученных ранее ДОЭ [15]. Фазовые распределения элементов представлены на рис. 3г, д.

3. Результаты эксперимента и обсуждение

3.1. Аппаратная функция микрообъектива

В настоящей работе сравнивались точности определения продольной координаты с использованием двух различ-

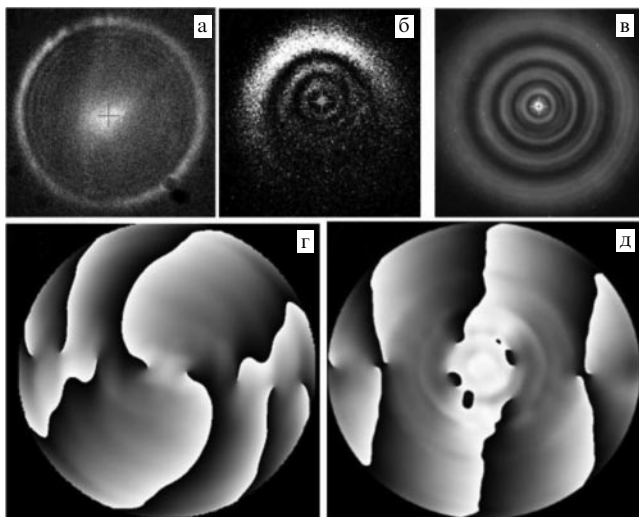


Рис. 3. Примеры пространственного распределения интенсивности люминесценции от одиночных точечных объектов в параллельных пучках, создаваемых высокоапертурными микрообъективами: (а) иммерсионный CFI Nikon 60×, 1,2NA, (б) CF Nikon 100×, 0,95NA, (в) Carl Zeiss 100×, 1,3NA. Пространственные распределения фазы, закодированные в градациях серого (чёрный — 0, белый — 2π) (так называемые фазовые маски): (г) неоптимизированная, (д) оптимизированная под распределение интенсивности, показанное на рис. 3в.

ных ДОЭ. Первый элемент был рассчитан для однородного по пространству распределения интенсивности падающего пучка. Второй — для неоднородного, приближённого к распределению интенсивности (рис. 3в), создаваемому используемым микрообъективом (Carl Zeiss 100×, 1,3NA). Необходимо отметить, что нами было проверено несколько микрообъективов с высокой числовой апертурой для использования в трёхмерной локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения. Для каждого объектива экспериментально определялось распределение интенсивности люминесценции в плоскости фазового модулятора, которое создавалось пучком от одиночного точечного объекта (КТ), помещённого в фокальную плоскость микрообъектива. На рисунке 3а–в показаны примеры распределения интенсивности для выбранного объектива (рис. 3в) и двух других объективов (рис. 3а, б).

Было обнаружено, что при использовании ряда объективов создаваемое распределение интенсивности не подходит для данной техники из-за неэффективного заполнения ДОЭ. По алгоритму, описанному в разделе 2.3, были проведены расчёты ДОЭ для двух случаев: неоптимизированный случай идеального однородного освещения (рис. 3г) и оптимизированный вариант (рис. 3д) с учётом распределения интенсивности, создаваемого конкретным микрообъективом (рис. 3в).

3.2. Калибровка биспиральной схемы с различными дифракционными оптическими элементами

С использованием рассчитанных ДОЭ были зарегистрированы двухлепестковые изображения одиночных КТ при различных (контролируемых с нанометровой точностью) глубинах залегания по отношению к фокальной плоскости микрообъектива. На рисунке 4 показаны примеры модифицированных изображений точечных источников (двухлепестковых изображений) при раз-

личных расстояниях между точечным источником и фокальной плоскостью микрообъектива. Видно, что в обоих случаях изменение расстояния приводит к повороту двухлепесткового изображения.

В случае оптимизированного ДОЭ (рис. 4б1–б3) двухлепестковое изображение состоит из двух симметричных пятен, близких по форме к двумерной функции Гаусса. Характерные размеры лепестков $\sigma_{\text{PSF}} = 259$ нм (среднеквадратичное отклонение, СКО, полученное из аппроксимации двумерной функцией Гаусса) близки к размеру изображения точечного объекта без использования ДОЭ, $\sigma_{\text{PSF}} = 234$ нм.

В случае неоптимизированной фазовой маски (рис. 4а1–а3) лепестки имеют несимметричную форму, которая изменяется при повороте изображения. Кроме того, средняя характерная ширина лепестков в 1,3 раза больше, чем в случае оптимизированной маски.

Для сопоставления угла поворота двухлепесткового изображения α (показан на рис. 4б3) и расстояния от точечного объекта до фокальной плоскости объектива Z была проведена процедура калибровки ДОЭ. Для этого проводилось последовательное перемещение микрообъектива (вблизи фокуса) вдоль оптической оси с шагом 30 и 60 нм (для оптимизированного и неоптимизированного ДОЭ соответственно) и регистрация двухлепестковых изображений. Электромеханический пьезоманипулятор обеспечивал контроль перемещения с абсолютной точностью не хуже 1 нм. На каждом шаге перемещения проводилась серия из 100 последовательных измерений двухлепестковых изображений (для увеличения точности определения угла поворота) с временем экспозиции кадра 200 мс. Для обработки изображений использовалась программа, основанная на алгоритмах аппроксимации отдельных лепестков изображений двумерными функциями Гаусса [5, 6]. В результате аппроксимации получался набор параметров для каждого из лепестков: среднеквадратичные отклонения σ_{PSF} (ширина лепестков) и восстановленные с субдифракционной точностью поперечные координаты лепестков (x, y) . Восстановленные координаты использовались для определения тангенса угла поворота изображения: $\tan \alpha = (y_2 - y_1)/(x_2 - x_1)$ и центра тяжести двухлепесткового изображения $X = (x_1 + x_2)/2$, $Y = (y_1 + y_2)/2$. Для каждой глубины залегания точечного источника по отношению к фокальной плоскости микрообъектива (при фиксированном положении пьезосканера) строилось распределение значений угла α и проводилась его аппроксимация функцией Гаусса (см. пример на вставке к рис. 4б). Центр каждого такого распределения использовался в качестве найденного значения угла α при заданном значении Z для построения калибровочной кривой $Z(\alpha)$. На рисунке 4а, б показаны калибровочные зависимости, полученные для неоптимизированной и оптимизированной масок соответственно. Скорость вращения двухлепесткового изображения составила $k = 1,5$ мкм рад⁻¹ (оптимизированная) и $k = 0,9$ мкм рад⁻¹ (неоптимизированная).

Получив калибровочные кривые, мы провели серию экспериментов для оценки точности восстановления продольной координаты. В качестве параметра точности использовалась величина среднеквадратичного отклонения σ_z для значений восстановленных координат, полученных в серии измерений с фиксированными параметрами. Проводились эксперименты двух типов. В первом случае исследовалась зависимость точности

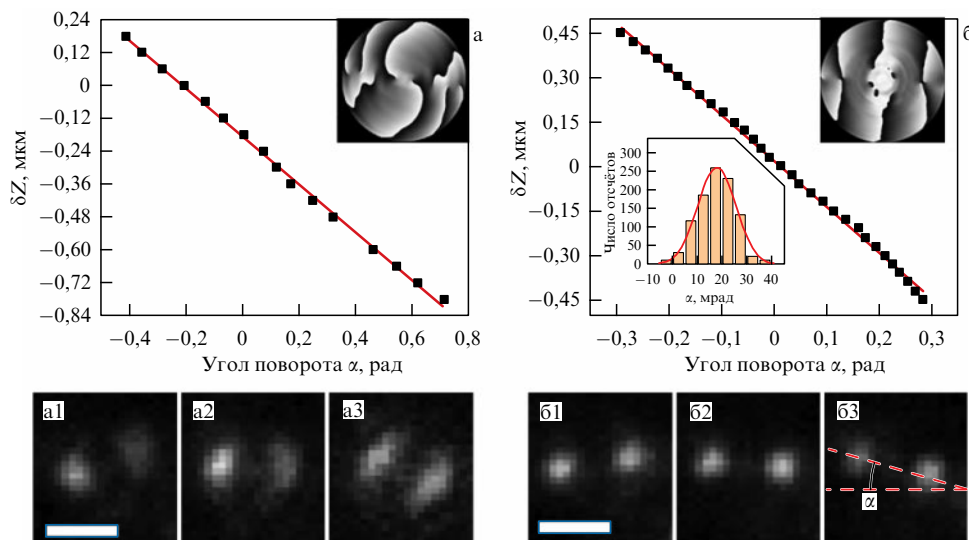


Рис. 4. Калибровочные кривые для неоптимизированного (а) и оптимизированного (б) ДОО. Примеры модифицированных изображений точечных источников (двухлепестковых изображений) при различных расстояниях между точечным источником и фокальной плоскостью микрообъектива для неоптимизированного (а1–3) и оптимизированного (б1–3) ДОО. Масштаб на всех рисунках одинаков: длина белых прямоугольников соответствует 1 мкм.

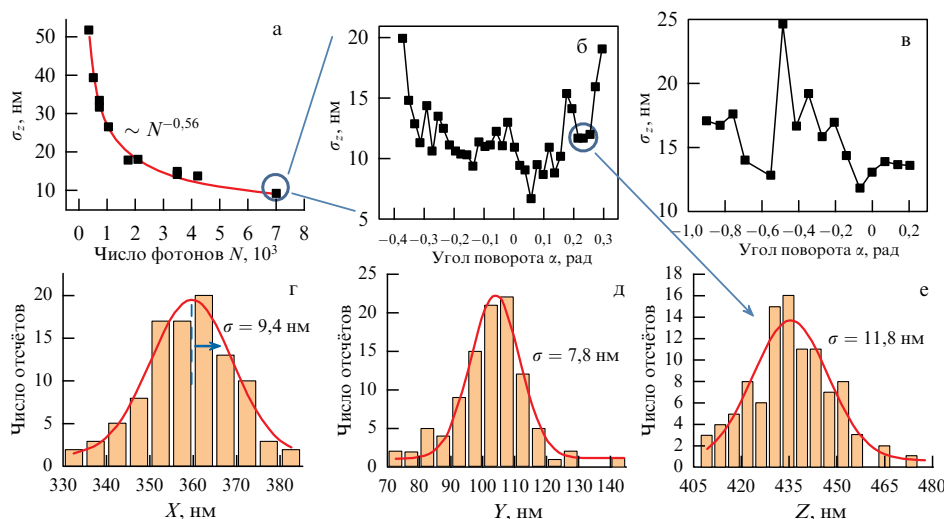


Рис. 5. Точность восстановления продольной координаты одиночного точечного объекта. (а) Зависимость точности восстановления продольной координаты σ_z от числа фотонов, формирующих двухлепестковое изображение, для угла наклона $\alpha \sim 0$ (точечный объект в фокусе) с использованием оптимизированного ДОО. Зависимость имеет вид обратной корневой зависимости. (б) Зависимость точности восстановления продольной координаты σ_z от угла наклона α в случае оптимизированного ДОО для области, выделенной на рис. 5а (7000 фотонов). (в) Аналогичная зависимость для неоптимизированного ДОО (7000 фотонов). (г–е) Пример распределения значений восстановленных поперечных (г, д) и продольной (е) координат квантовой точки, флуоресцентное изображение которой измерялось многократно.

$\sigma_z(N)$ при вариации числа фотонов N , создающих двухлепестковое изображение, и фиксированном положении пьезосканера Z (фиксированном угле поворота двухлепесткового изображения α). Во втором случае исследовалась точность $\sigma_z(\alpha)$ в зависимости от положения сканера Z (от угла поворота изображения α) при фиксированном числе фотонов.

3.3. Точность восстановления пространственных координат точечных излучателей в зависимости от различных факторов

На рисунке 5г–е показаны примеры распределений восстановленных координат X , Y , Z , полученных в серии

из 100 последовательных измерений при фиксированных значениях α и N , а также указаны соответствующие СКО ($\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z$). Разброс каждой из координат определяется тремя вкладками. Первый вклад связан с дробовым шумом числа фотонов, попавших в отдельные пиксели камеры, соответствующие двухлепестковому изображению. Это приводит к вариации формы двухлепестковых изображений в серии измерений и, как следствие, к вариации восстанавливаемых координат.

Данный вклад в точность восстановления поперечных координат центра тяжести двухлепесткового изображения для симметричных лепестков гауссовой формы может быть описан выражением (не учитывающим воз-

можной шумовой подставки)

$$\sigma_{x,y} = \frac{\sigma_{\text{PSF}}}{\sqrt{N}}, \quad (1)$$

где σ_{PSF} — характерная ширина лепестков, N — число фотоотсчётов, формирующих двухлепестковое изображение. Более точное выражение учитывает отношение сигнала к шуму, а также параметр, характеризующий пространственную дискретность изображения [30]. Оценка для случая, показанного на рис. 5г, д ($N = 7000$, $\alpha \sim 0,2$ рад), с использованием приведённого выражения даёт значение $\sigma_{x,y} \sim 3$ нм, что в несколько раз меньше значений СКО, полученных экспериментально.

В случае малых углов поворота случайная погрешность для продольной координаты имеет простую связь с погрешностями поперечных координат:

$$\sigma_z = \frac{2k\sigma_{x,y}}{d} = \frac{2k\sigma_{\text{PSF}}}{d\sqrt{N}}, \quad (2)$$

где k — скорость вращения двухлепесткового изображения, d — расстояние между центрами лепестков. Оценка для оптимизированного ДОЭ при $N = 7000$ даёт значение $\sigma_z = 10,4$ нм, что близко к значениям, полученным экспериментально (рис. 5б, е).

Второй вклад определяется дрейфом изображения точечного излучателя, что может быть связано, например, с броуновским движением излучателя в вязкой среде или механической нестабильностью оптических элементов микроскопа. В проведённых экспериментах дрейф был связан с механической нестабильностью системы фокусировки микроскопа. Это приводило к одинаковому дрейфу всех точечных излучателей в поле зрения микроскопа. На рисунке 6б показан пример временной эволюции восстановленной координаты Z точечного излучателя с квазилинейным дрейфом вдоль оси z со скоростью $0,3$ нм с^{-1} . Данный эффект приводит к уширению распределения координат и соответственно к росту измеряемой погрешности. Чтобы учесть данный паразитный эффект, проводилась процедура оценки скорости дрейфа и компенсация сдвига координат.

Третий вклад в погрешность связан с тем, что используемые в эксперименте излучатели представляют собой точечные агломерации, состоящие из небольшого числа КТ. Независимое мерцание КТ вызывает пространственное перераспределение картины люминесценции на субдифракционном уровне, что приводит к перемещению центра свечения агломерации. На рисунке 6г показаны примеры временных эволюций восстановленных поперечных координат (X, Y) центра тяжести двухлепесткового изображения. Видно, что восстановленные координаты претерпевают плавные и скачкообразные изменения в диапазоне расстояний в несколько десятков нанометров. Такой эффект не наблюдается в случае одиночных КТ и уникален для каждой из одновременно измеряемых агломераций. Это свидетельствует в пользу того, что описанный эффект не связан с механической нестабильностью микроскопа или гипотетическим дрейфом отдельных агломераций по стеклянной подложке.

Необходимо отметить, что именно данный вклад приводит к существенному отличию оценки погрешности, получаемой для поперечных координат (X, Y) с помощью выражения (1), от экспериментальных значений

(в 2–3 раза для $N = 7000$). В случае продольной координаты разница получилась небольшой, что, с одной стороны, связано с существенно большим значением "минимальной" σ_z (из выражения (2)), а, с другой стороны, с тем, что агломерация является плоской (вытянута в плоскости xu), что приводит к отсутствию регистрируемого перемещения центра свечения вдоль оси Z . Таким образом, полученные результаты показывают, что с точки зрения исследования свойств преобразования продольной координаты во вращение изображения используемые точечные агломерации КТ могут служить хорошим модельным точечным объектом.

На рисунке 5б, в показаны примеры зависимости σ_z от угла поворота изображения α для оптимизированного и неоптимизированного ДОЭ соответственно при фиксированном числе фотонов $N = 7000$. Видно, что в случае оптимизированного ДОЭ точность восстановления координат в среднем в 1,5 раза выше. На краях зависимости $\sigma_z(\alpha)$ для оптимизированного ДОЭ происходит возрастание погрешности σ_z . Это связано с тем, что при больших значениях угла (по модулю) уменьшается эффективность преобразования пучка во вращающееся двухлепестковое изображение [15]: существенно большая часть света в этих случаях перераспределяется в дополнительные дифракционные максимумы, которые приводят к эффективно увеличению шумовой подставки (уменьшению отношения сигнала к шуму). Кроме того, при этом происходит деформация двухлепесткового изображения. Необходимо также отметить, что прямое сравнение точности восстановления Z -координаты для двух рассмотренных ДОЭ с использованием выражения (2) невозможно. Действительно, в случае неоптимизированного ДОЭ (а также при больших углах с оптимизированным ДОЭ) изображения лепестков несимметричны и находятся на более высокой шумовой подставке. В таком случае для описания погрешности выражение (2) неприменимо.

На рисунке 5а показана зависимость точности восстановления продольной координаты одиночного точечного объекта от числа фотоотсчётов N для угла наклона $\alpha \sim 0$ (точечный объект находится вблизи фокусной плоскости микроскопа) с использованием оптимизированного ДОЭ. Полученная кривая имеет вид обратной корневой зависимости от числа фотоотсчётов N , что хорошо согласуется с выражением (2). Подобные кривые для координат центра тяжести изображения X, Y не были построены, поскольку содержат дополнительный вклад в погрешность, который обсуждался выше. В случае одиночной квантовой точки зависимость точности восстановления поперечных координат X, Y имеет похожий вид [25].

Для демонстрации возможности восстановления продольной координаты с точностью порядка 11 нм при однократном измерении ($N = 7000$) на рис. 6а показана временная эволюция восстановленной продольной координаты Z в эксперименте с последовательным перемещением образца с помощью пьезоподвижки с шагом 30 нм и измерением 100 изображений на каждом шаге. Среднее число фотоотсчётов в каждом изображении было близко к 7000. Видно, что временная эволюция представляет собой ступенчатый график с хорошо различимыми шагами. Ширина каждой "полочки" определяется точностью восстановления координат в однократном измерении. На рисунке 6в показаны также примеры регистра-

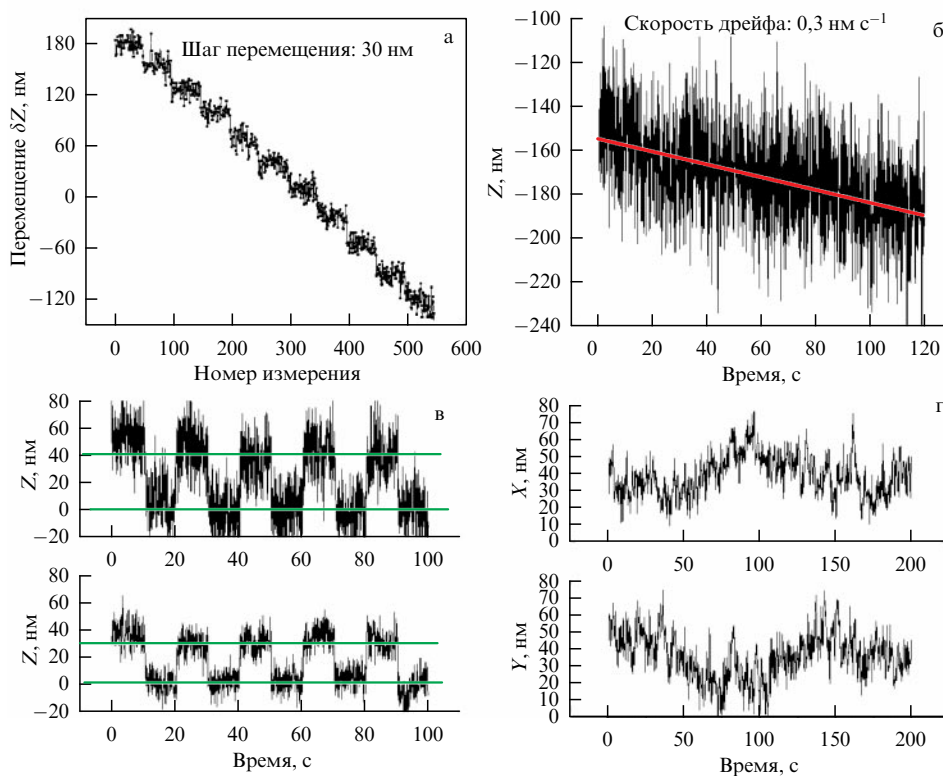


Рис. 6. Примеры регистрации перемещения одиночного точечного излучателя вдоль оси z с использованием оптимизированного ДОЭ. (а) Эксперимент с контролируемым перемещением образца (с шагом 30 нм) вдоль оси z с помощью пьезосканера. На каждом шаге пьезосканера проводилось 100 измерений с временем накопления 200 мс. Точность восстановления Z -координаты соответствует значению ~ 11 нм (рис. 5б). (б) Наблюдение квазилинейного дрейфа точечного излучателя (вместе со стеклянной подложкой) вдоль оси z , связанного с механической нестабильностью системы фокусировки микроскопа. Скорость дрейфа составляет $\sim 0,3$ нм s^{-1} . (в) Примеры регистрации циклического перемещения точечного излучателя с помощью пьезосканера на 30 нм для оптимизированной фазовой маски (внизу) и на 40 нм для неоптимизированной (вверху). (г) Примеры временной эволюции восстановленных поперечных координат центра тяжести двухлепесткового изображения с наблюдаемым перемещением центра свечения в мерцающей точечной агломерации: X (вверху), Y (внизу). Время экспозиции в обоих примерах 200 мс, среднее число фотоотсчётов в двухлепестковом изображении $N = 7000$.

ции циклического перемещения точечного излучателя вдоль Z на расстояние 30 нм для оптимизированной фазовой маски (внизу) и на 40 нм для неоптимизированной (вверху). Приведённый пример демонстрирует разницу в точности восстановления координат с использованием исследованных ДОЭ.

3.4. 3D-наноскопия одиночных коллоидных полупроводниковых квантовых точек, проявляющих эффект мерцания люминесценции

Для демонстрации возможности использования оптимизированного ДОЭ с одиночными коллоидными квантовыми точками CdSeS/ZnS был проведён ряд экспериментов. На рисунке 7в показаны двухлепестковые люминесцентные изображения одиночных коллоидных КТ CdSeS/ZnS в поле зрения микроскопа. Плотность мощности возбуждающего излучения составляла ~ 100 Вт $см^{-2}$, время накопления 500 мс. На рисунке 7а показан пример мерцающей люминесцентной траектории одиночной КТ, отмеченной на рис. 7в. Интенсивность люминесценции КТ претерпевает изменения (мерцание) из-за вариации соотношения между скоростями излучательной и безызлучательной релаксации электронно-дырочной пары [31–33]. С точки зрения локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения мерцание КТ приводит к изменению числа фотоотсчётов, формирующих двухлепестковое изображение,

и, следовательно, к вариации погрешности σ_z восстановления координат в последовательных измерениях при неизменной плотности мощности возбуждающего лазерного излучения. На рисунке 7б приведено распределение значений продольной координаты, соответствующее диапазону интенсивности люминесценции со средним числом фотоотсчётов $N = 1500$ (рис. 7а). Точность восстановления продольной координаты для этого диапазона составила $\sigma_z = 26$ нм, что близко к величине оценки, полученной из выражения (2): ~ 23 нм для $N = 1500$. Для моментов времени на флуоресцентной траектории, отвечающих максимальным значениям люминесценции траектории (рис. 7а) $N \sim 3000$ фотоотсчётов/500 мс, точность должна соответствовать значению $\sigma_z \sim 18$ нм, что на порядок выше значений, определяемых дифракционным ограничением.

Теперь обратимся к вопросу о том, как можно повысить точность определения координат с использованием одиночных КТ. Естественно, что увеличивая время накопления, мы будем увеличивать число фотоотсчётов N , однако при этом уменьшается временное разрешение, которое в случае трекинга частиц является не менее важным параметром. Более того, возрастает и погрешность определения координаты из-за дрейфа (исследуемого или паразитного). Поэтому данный параметр не может варьироваться в широких пределах и в каждом конкретном случае должен выбираться исходя из тре-

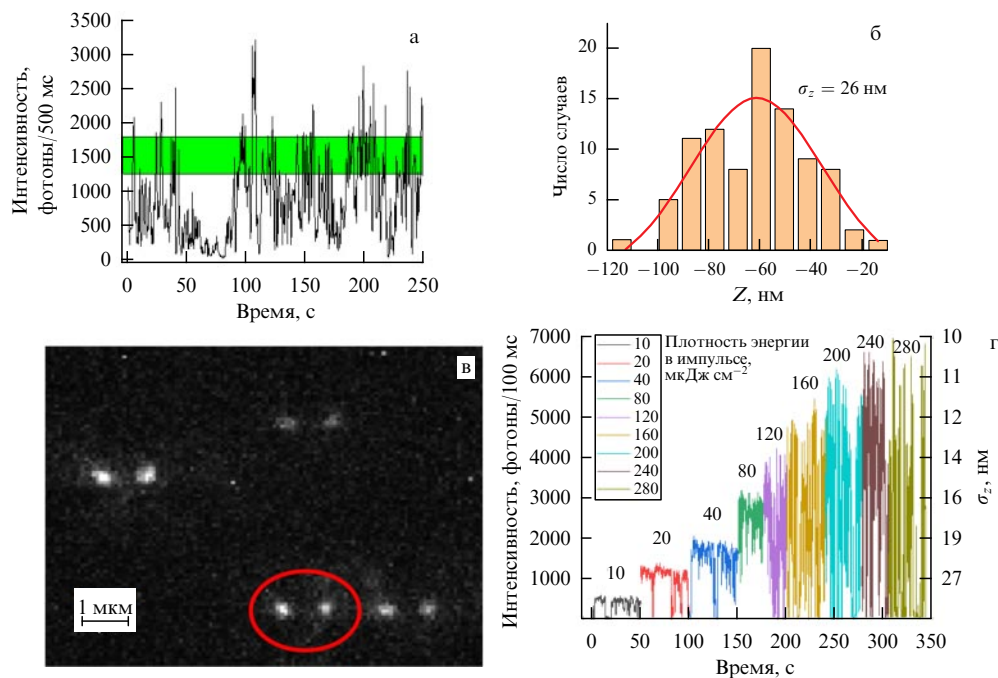


Рис. 7. (В цвете онлайн.) Восстановление продольной координаты одиночных квантовых точек CdSeS/ZnS с использованием оптимизированного ДОЭ и эволюция люминесцентной траектории с увеличением интенсивности импульсного лазерного возбуждения. (а) Пример мерцающей люминесцентной траектории одиночной КТ, двухлепестковое изображение которой выделено овалом на рис. 7в. Плотность мощности возбуждающего излучения $\sim 100 \text{ Вт см}^{-2}$, время накопления 500 мс. (б) Распределение продольной координаты z , соответствующее диапазону интенсивности люминесценции со средним числом фотоотсчетов $N = 1500$. (в) Люминесцентное изображение поля зрения микроскопа, содержащее двухлепестковые изображения одиночных коллоидных КТ CdSeS/ZnS. (г) Эволюция мерцающей траектории, измеренная без использования пространственного фазового модулятора, при увеличении плотности энергии в импульсе лазерного возбуждения от 10 до 280 мкДж см^{-2} . Длина волны 580 нм, частота повторения 1 МГц, длительность импульса 1 пс. Правая шкала графика демонстрирует расчётные значения точности восстановления координат в идеальном случае (при 100%-ной эффективности преобразования ДОЭ), соответствующие различным интенсивностям лазерного возбуждения одиночной КТ.

бований задачи. Помимо времени экспозиции, число фотонов люминесценции может быть увеличено за счёт увеличения плотности мощности возбуждающего излучения. В этом случае также существуют ограничения сверху. Они связаны с насыщением квантовой точки и процессами мерцания. Насыщение связано с доминированием безызлучательной оже-рекомбинации при увеличении вероятности возбуждения КТ в состояния с более чем одной электронно-дырочной парой. Это приводит к уменьшению квантового выхода люминесценции с ростом интенсивности возбуждения. Максимальная интенсивность будет зависеть от времени жизни люминесценции ($\sim 25 \text{ нс}$ в ярком состоянии для КТ), а также от типа лазерного возбуждения КТ (импульсный/непрерывный).

Помимо эффекта насыщения с увеличением плотности мощности возбуждающего излучения происходит фотоактивация мерцания КТ (в том числе за счёт возрастания вероятности оже-переходов): возрастает вероятность переходов из яркого в тёмное состояние. На рисунке 7г показана эволюция мерцания одиночной КТ при увеличении интенсивности импульсного лазерного возбуждения (длина волны 580 нм, частота повторения 1 МГц, длительность импульса 1 пс). Видно, что с увеличением накачки происходит переход от люминесцентных траекторий с редкими переходами в тёмное состояние к изрезанным траекториям с большим числом промежуточных уровней интенсивности люминесценции. Помимо этого, происходит постепенный выход на плато для максимальной интенсивности люминесценции

в траектории (насыщение). Необходимо отметить, что эффект мерцания КТ создаёт определённые сложности при использовании одиночных КТ в экспериментах, когда требуется наперёд заданная точность восстановления координат. Но, с другой стороны, этот эффект позволяет внутри дифракционно ограниченной области "разрешить" (определить координаты с субдифракционной точностью) более одного точечного излучателя за счёт раздельной регистрации центров одиночных КТ [19].

Наконец, важным параметром, влияющим на число фотоотсчетов в двухлепестковом изображении, является суммарная эффективность преобразования пучка в двухлепестковое изображение: $\eta = k_{\text{pol}} k_{\text{dif}} k_{\text{conv}}$. В этой формуле k_{pol} — коэффициент, учитывающий потерю на линейном поляризаторе, который в случае одиночных КТ (излучения с естественной поляризацией света) составляет $k_{\text{pol}} = 0,5$; $k_{\text{dif}} = 0,6$ — коэффициент отражения в нулевой порядок, связанный с дифракцией на внутренней пиксельной структуре пространственного фазового модулятора; k_{conv} — эффективность преобразования пучка фазовой маской (80 % для оптимизированного ДОЭ, 65 % для неоптимизированного). Последний коэффициент k_{conv} [15] представляет собой отношение числа фотоотсчетов в двухлепестковом изображении, формируемом фазовой маской, к числу фотоотсчетов в "классическом" дифракционном изображении одного и того же точечного источника. Таким образом, суммарная эффективность оптимизированного ДОЭ $\eta = 0,2$, т.е. в двухлепестковое изображение попадает $\sim 20 \%$ фотонов из числа тех, что регистрируются в эксперименте без

использования фазового модулятора. На рисунке 7г (правая шкала графика) приведены расчётные значения точности восстановления координат одиночной КТ при времени накопления 100 мс и 100 %-ной эффективности ДОЭ, соответствующие различным интенсивностям лазерного возбуждения одиночной КТ (включая режим насыщения). Увеличение суммарной эффективности (вплоть до значений близких к 100 %) возможно за счёт использования вместо жидкокристаллических пространственных фазовых модуляторов стационарных литографированных ДОЭ, позволяющих преобразовывать обе ортогональные поляризации света одновременно.

4. Заключение

В настоящей работе рассмотрена техника трёхмерной локализационной микроскопии сверхвысокого пространственного разрешения с детектированием трансформированных флуоресцентных изображений одиночных квантовых излучателей (полупроводниковых коллоидных квантовых точек). Нанометровое пространственное разрешение при восстановлении всех трёх координат одиночных КТ достигается с помощью модификации функции рассеяния точки системы за счёт использования фазовых пространственных преобразователей светового поля (дифракционных оптических элементов), полученных на основе оптики спиральных пучков света и обеспечивающих формирование двухлепестковых световых полей с вращением распределения интенсивности при распространении [12, 16]. Рассчитаны новые ДОЭ, обеспечивающие высокую эффективность преобразования световых пучков в диапазоне значений продольного перемещения точечного объекта ~ 500 нм, соответствующих задачам дальнеполевой наноскопии, с использованием высокоапертурного микрообъектива.

Проведён теоретический и экспериментальный анализ точности восстановления координат одиночных точечных излучателей. Рассмотрена природа шумов, дающих основной вклад в погрешность определения координат, а также влияние формы двухлепесткового изображения, параметра вращения, числа фотоотсчётов, формирующего изображение, и расстояния между точечным объектом и фокальной плоскостью микроскопа на точность определения координат точечного излучателя. Показано, что точность восстановления продольной координаты уменьшается на краях диапазона вращения двухлепесткового изображения и имеет форму обратной корневой зависимости от числа фотоотсчётов. Проведено экспериментальное сравнение двух ДОЭ: оптимизированного на работу в малом диапазоне изменения продольных координат (~ 600 нм) с учётом распределения поля в пучке, создаваемом высокоапертурным микрообъективом от точечного источника излучения, а также ДОЭ, рассчитанного на работу в большем диапазоне изменения продольной координаты (~ 1 мкм) и предназначенного для пучка с равномерным распределением поля. Показано, что точность определения продольной координаты в среднем в 1,5 раза выше в случае оптимизированного ДОЭ, несмотря на то что параметр скорости вращения двухлепесткового изображения оказался выше в случае неоптимизированного ДОЭ. Данный результат связан с влиянием на точность восстановления координат асимметричности двухлепесткового изображения в случае неоптимизированного ДОЭ, большей характерной ши-

риной лепестков, а также меньшей эффективностью преобразования. Экспериментально продемонстрирована возможность нанометрового трекинга точечного излучателя в продольном направлении с точностью в диапазоне вплоть до 500 нм.

Проведены эксперименты с одиночными квантовыми точками CdSeS/ZnS. Продемонстрирована возможность использования оптимизированного ДОЭ для трёхмерного определения пространственного положения одиночных КТ с нанометровой точностью по всем трём координатам. Приведены оценки точности восстановления продольной координаты одиночной КТ CdSeS/ZnS в случае идеального ДОЭ и оптимального с точки зрения трекинга времени накопления сигнала (100 мс) в зависимости от интенсивности возбуждающего излучения. Показано, что в случае насыщения КТ точность определения продольной координаты может достигать значений ~ 10 нм при временах экспозиции ~ 100 мс. Помимо этого, были рассмотрены вопросы влияния экспериментальных параметров: времени накопления сигнала, плотности мощности возбуждающего лазерного излучения, суммарной эффективности преобразования пучка в двухлепестковое изображение на точность восстановления координаты одиночной КТ. Приводится оценка суммарной эффективности преобразования пучка в двухлепестковое изображение в случае использования жидкокристаллического пространственного фазового модулятора света.

Благодарности

Тема Государственного задания ФИАН им. П.Н. Лебедева АААА-А19-119083090053-9 поддержана Министерством науки и высшего образования РФ. Авторы благодарят за поддержку Российский фонд фундаментальных исследований (И.Т.М. — грант № 20-02-00871; Д.В.П., Н.Н.Л., С.П.К. — гранты №№ 19-32-90078, 20-02-00671). Работы по направлению "Физика наноструктурированных материалов: фундаментальные исследования и приложения в материаловедении, нанотехнологиях и фотонике" поддержаны Министерством просвещения РФ в рамках темы ГЗ МПГУ (А.В.Н. — тема АААА-20-120061890084-9). А.В.Н., И.Т.М., И.Ю.Е. входят в состав Ведущей научной школы РФ (Грант Президента НШ-776.2022.1.2).

Список литературы

1. Moerner W E *Angew. Chem. Int. Edit.* **54** 8067 (2015)
2. Betzig E *Angew. Chem. Int. Edit.* **54** 8034 (2015)
3. Hell S W *Angew. Chem. Int. Edit.* **54** 8054 (2015)
4. Möckl L, Moerner W E *J. Am. Chem. Soc.* **142** 17828 (2020)
5. Naumov A, Eremchev I Yu, Gorshchev A A *Eur. Phys. J. D* **68** 348 (2014)
6. Наумов А В *УФН* **183** 633 (2013); Naumov A V *Phys. Usp.* **56** 605 (2013)
7. Huang B et al. *Science* **319** 810 (2008)
8. Liu L X et al. *Laser Optoelectron. Prog.* **57** 14 (2020)
9. Майорова А М *Фотоника* **12** 134 (2018)
10. Khonina S N et al. *J. Mod. Opt.* **46** 227 (1999)
11. Абрамочкин Е Г, Волостников В Г *УФН* **174** 1273 (2004); Abramochkin E G, Volostnikov V G *Phys. Usp.* **47** 1177 (2004)
12. Pavani S R P, Piestun R *Opt. Express* **16** 22048 (2008)
13. Волостников В Г *УФН* **182** 442 (2012); Volostnikov V G *Phys. Usp.* **55** 412 (2012)
14. Shechtman Y et al. *Nano Lett.* **15** 4194 (2015)
15. Проконова Д В и др. *Изв. РАН. Сер. физ.* **83** 1612 (2019); Prokopova D V et al. *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* **83** 1453 (2019)

16. Ravani S R P et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** 2995 (2009)
17. von Diezmann L, Shechtman Y, Moerner W E *Chem. Rev.* **117** 7244 (2017)
18. Баев А А и др. *Изв. РАН. Сер. физ.* **82** 1140 (2018); Baev A A et al. *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* **82** 1034 (2018)
19. Еремчев И Ю и др. *Письма в ЖЭТФ* **108** 26 (2018); Eremchev I Yu et al. *JETP Lett.* **108** 30 (2018)
20. Möckl L, Roy A R, Moerner W E *Biomed. Opt. Express* **11** 1633 (2020)
21. Разумов В Ф *УФН* **186** 1368 (2016); Razumov V F *Phys. Usp.* **59** 1258 (2016)
22. Аржанов А И и др. *Фотоника* **15** 622 (2021)
23. Аржанов А И и др. *Фотоника* **16** 96 (2022)
24. Кулик С И и др. *Журн. прикладной спектроскопии* **85** 814 (2018); Kulik S I et al. *J. Appl. Spectrosc.* **85** 916 (2018)
25. Еремчев И Ю, Еремчев М Ю, Наумов А В *УФН* **189** 312 (2019); Eremchev I Yu, Eremchev M Yu, Naumov A V *Phys. Usp.* **62** 294 (2019)
26. Razuvaeva E, Abramochkin E J. *Opt. Soc. Am. A* **36** 1089 (2019)
27. Волостников В Г и др. *Изв. РАН. Сер. физ.* **80** 841 (2016); Volostnikov V G et al. *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* **80** 766 (2016)
28. Воронцов Е Н и др. *Краткие сообщ. по физике ФИАН* **45** (3) 9 (2018); Vorontsov E N et al. *Bull. Lebedev Phys. Inst.* **45** (3) 71 (2018)
29. Прокопова Д В, Котова С П *Фотоника* **14** 170 (2020)
30. Mortensen K I et al. *Nat. Meth.* **7** 377 (2010)
31. Efros A L, Rosen M *Phys. Rev. Lett.* **78** 1110 (1997)
32. Frantsuzov P A, Vólkan-Kacsó S, Jankó B *Phys. Rev. Lett.* **103** 207402 (2009)
33. Osad'ko I S, Eremchev I Yu, Naumov A V *J. Phys. Chem. C* **119** 22646 (2015)

Three-dimensional fluorescence nanoscopy of single quantum emitters based on the optics of spiral light beams

I.Yu. Eremchev^(1,2,a), D.V. Prokopova⁽³⁾, N.N. Losevskii⁽³⁾, I.T. Mynzhasarov^(2,4), S.P. Kotova^(3,b), A.V. Naumov^(1,2,4,5,c)

⁽¹⁾ Institute of Spectroscopy, Russian Academy of Sciences, ul. Fizicheskaya 5, 108840 Troitsk, Moscow, Russian Federation

⁽²⁾ Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Troitsk Branch, ul. Fizicheskaya 11, 108840 Troitsk, Moscow, Russian Federation

⁽³⁾ Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Samara Branch, ul. Novo-Sadovaya 221, 443011 Samara, Russian Federation

⁽⁴⁾ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Institutskii per. 9, 141701 Dolgoprudny, Moscow region, Russian Federation

⁽⁵⁾ Moscow State Pedagogical University, ul. Malaya Pirogovskaya 1, 119991 Moscow, Russian Federation

E-mail: ^(a) eremchev@isan.troitsk.ru, ^(b) kotova@fian.smr.ru, ^(c) a_v_naumov@mail.ru

Far-field superresolution fluorescence microscopy (nanoscopy), awarded the Nobel Prize in Chemistry in 2014, has become one of the most powerful tools in multidisciplinary applications of photonics. In this paper, we discuss the technique of three-dimensional nanoscopy with the detection of transformed fluorescence images of single quantum emitters (using the example of semiconductor colloidal quantum dots, QDs). Nanoscale spatial resolution when reconstructing all three coordinates of single QDs is achieved by the instrumental modification of the point spread function using highly efficient light phase spatial modulators (diffractive optical elements, DOEs). DOE phase distributions, which ensure the formation of two-lobe light fields (with rotation of the intensity distribution during light propagation), were obtained on the basis of the optics of spiral light beams. The question of calculating DOEs that provide the best conversion efficiency of light beams is discussed. Theoretical and experimental analyses of the accuracy of the method were carried out depending on the experimental parameters: QD photoluminescence intensity, signal acquisition time, laser excitation power, and the instrumental function of the microscope objective. It is shown that, for the studied CdSeS/ZnS QDs, the accuracy of determining the coordinates can reach values of ~ 10 nm at exposure times of ~ 100 ms.

Keywords: luminescence, microscopy, nanoscopy, diffraction limit, spatial resolution, single molecule, quantum dot, point spread function, adaptive optics, diffractive optical element, Laguerre–Gauss modes, spiral beams, double helix point spread function, DHPSF, quantum optics, nanodiagnosics, sensorics

PACS numbers: **42.79. – e**, **78.55. – m**, 78.67.Hc

Bibliography — 33 references

Received 10 March 2021

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **192** (6) 663–673 (2022)

Physics – Uspekhi **65** (6) (2022)

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2021.05.038982>

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNe.2021.05.038982>