

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
Московский педагогический государственный университет**

На правах рукописи

Щукина Александра Леонидовна

**ФЛУКТУИРУЮЩАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ
ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ**

Специальность 01.04.05 – Оптика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

д. ф.-м. н., профессор

Осадько И.С.

Москва – 2012

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Глава 1. Одиночные флуоресцирующие частицы	12
1.1. Бесфононные линии и фононные крылья в оптических полосах.....	12
1.2. Проблема неоднородного уширения оптических полос.....	13
1.3. Спектроскопия одиночных частиц: проблемы и первые эксперименты.....	15
1.4. Спектроскопия одиночных молекул при комнатных температурах: конфокальная микроскопия.....	19
Глава 2. Статистика флуктуаций интенсивности флуоресценции одиночных молекул	21
2.1. Теория Манделя для статистики излучения.....	21
2.2. Флуктуации интенсивности флуоресценции одиночных молекул.....	23
А. Двухуровневая молекула.....	23
А1. Старт-стоп коррелятор.....	24
А2. Распределение числа фотонов.....	27
А3. Полный двухфотонный коррелятор.....	30
А4. Автокорреляционная функция.....	31
Б. Трёхуровневая молекула.....	32
Б1. Старт-стоп коррелятор.....	34
Б2. Распределение числа фотонов.....	36
Б3. Полный двухфотонный коррелятор и автокорреляционная функция.....	37
Б4. Распределение on/off интервалов.....	38
Глава 3. Флуктуирующая флуоресценция ансамбля одиночных не взаимодействующих молекул	42
3.1. Функция распределения числа фотонов флуоресценции нескольких не взаимодействующих молекул.....	42

3.2. Параметр Манделя для флуоресценции нескольких невзаимодействующих молекул.....	45
3.3. Распределение длительностей on- и off-интервалов во флуоресценции нескольких невзаимодействующих молекул.....	46
3.4. Полный двухфотонный коррелятор и автокорреляционная функция флуоресценции нескольких невзаимодействующих молекул.....	50
3.5. Сравнение теории с экспериментом.....	56
3.6. Основные выводы главы 3.....	57
Глава 4. Безызлучательная передача энергии электронного возбуждения между молекулами.....	59
4.1. Безызлучательная передача энергии при фотосинтезе.....	59
4.2. Классические теории передачи энергии между молекулами.....	62
4.3. Ранние квантовые теории передачи энергии от донора к акцептору.....	64
4.4. Теория Фёрстера.....	66
4.4.1. Скорость передачи энергии.....	66
4.4.2. Эффективность передачи энергии. Фёрстеровский радиус.....	69
4.4.2. Ориентационный фактор.....	71
4.5. Теория Декстера.....	72
4.5.1. Роль высших мультиполей в передаче энергии.....	72
4.5.2. Перенос энергии по триплетным уровням.....	73
4.6. Передача энергии между молекулами с помощью экситонов.....	75
4.7. Проблемы, возникающие при исследовании FRET в ансамблях молекул.....	77
4.8. FRET в одиночных донор-акцепторных парах.....	80
Глава 5. Флуктуирующая флуоресценция одиночной донор-акцепторной пары.....	94
5.1. Флуктуации флуоресценции двухуровневого донора и двухуровневого акцептора (2Д-2А пара).....	95
5.2. Влияние триплетного уровня донора на флуоресценцию двухуровневого акцептора (3Д-2А пара).....	102

5.3. Влияние триплетного уровня акцептора на флуоресценцию 2Д-3А пары.....	109
5.4. Флуктуации флуоресценции трёхуровневого донора и трёхуровневого акцептора (3Д-3А пара).....	120
5.5. Эффективность передачи энергии в донор-акцепторных парах различного типа.....	125
5.6. Сравнение теории с экспериментом.....	129
5.7. Основные выводы главы 5.....	133
Заключение.....	134
Список использованной литературы.....	137
Список сокращений	
Список рисунков	
Список формул	

ВВЕДЕНИЕ

Любые процессы, связанные с поглощением или испусканием фотона, происходят случайным образом. Флуоресценция одиночных молекул, возбуждаемых светом непрерывного лазера, состоит из череды фотонов, испущенных в случайные моменты времени, т.е. она флуктуирует. Эти флуктуации несут в себе важную информацию о квантовой динамике объекта и его взаимодействии с локальным окружением и являются центральным объектом исследования спектроскопии одиночных молекул (СОМ).

Флуоресценция одиночных частиц начала экспериментально изучаться в конце 1970-х годов. Тогда удалось зарегистрировать флуоресценцию отдельных атомов [1, 2]. Вплоть до этого времени экспериментаторы наблюдали только флуоресценцию ансамбля излучающих частиц – атомов, ионов, молекул. Так как каждая из частиц ансамбля имеет разное локальное окружение, и, следовательно, разные спектральные характеристики, общая картина флуоресценции получалась «сглаженной». Усреднение по ансамблю не давало возможности наблюдать флуктуации, проявляющиеся при наблюдении одиночных объектов. Поэтому развитие спектроскопии одиночных атомов, а позднее, в начале 1990-х годов, СОМ явилось огромным шагом вперёд.

Флуктуации интенсивности флуоресценции (которые представляют собой предмет данной диссертации) или частот поглощения и излучения, которые позволяет наблюдать СОМ, можно обрабатывать статистически различными способами. Различные вероятности и дают необходимую информацию о флуоресцирующем объекте.

Однако эксперимент не всегда даёт возможность с уверенностью ответить на вопрос, регистрируется ли флуоресценция одной молекулы или нескольких. Для этого необходимы теоретические выражения, позволяющие рассчитать различные вероятности для фотонов флуоресценции как в случае попадания в пятно лазерного луча накачки одной молекулы, так и нескольких. Такие выражения для одиночных молекул были получены [3, 4]

в последние годы. В данной диссертации выведены теоретические выражения различных функций распределения для нескольких одиночных не взаимодействующих молекул и для одиночных донор-акцепторных (Д-А) пар.

Актуальность темы диссертации.

К настоящему времени СОМ проявила себя как новый эффективный инструмент для исследования квантовой динамики индивидуальных молекул с помощью флуктуаций флуоресценции. Эти флуктуации после надлежащей статистической обработки позволяют найти вероятности разных типов, например, автокорреляционную функцию $g^{(2)}(t)$ флуоресценции, параметр Манделя $Q(t)$, функцию распределения $w_N(t)$ фотонов флуоресценции, т.е. вероятность обнаружить N фотонов на временном интервале длительности t , и ряд других вероятностей.

Чрезвычайно важным обстоятельством является то, что эти и другие вероятности могут быть не только измерены в эксперименте, но и рассчитаны теорией на основе квантово-механической модели *одиночного* излучателя. Теория, рассчитывая эти вероятности, устанавливает связь между наблюдаемыми в эксперименте флуктуациями и микроскопической моделью одиночного излучателя.

Если флуоресценция одиночной молекулы флуктуирует, то флуоресценция двух, трёх, вообще небольшого числа индивидуальных молекул тоже будет ещё флуктуировать. Очевидно, что флуктуации флуоресценции небольших групп молекул, например одиночных донор-акцепторных пар, тоже можно использовать для анализа их динамики, если имеются теоретические выражения для вероятностей $g^{(2)}(t)$, $Q(t)$, $w_N(t)$ и вероятностей другого типа, которые соответствовали излучению нескольких молекул.

Однако, если теория для вероятностей, измеряемых в СОМ, развита уже достаточно полно [3, 4], то теория для вероятностей, измеряемых в

ансамблях нескольких молекул, практически отсутствует. Поэтому актуальность построения такой теории является несомненной.

Целью диссертационной работы является построение теории для различных типов вероятностей, которые могут быть измерены во флуоресцирующей флуоресценции молекулярных ансамблей. Такая теория должна показать, каким образом квантовое излучение одиночной молекулы постепенно превращается в классический свет по мере увеличения количества излучателей.

В связи с этой целью **задачи диссертации** могут быть сформулированы следующим образом:

1. Вывод теоретического выражения для функции распределения $w_N^M(T)$ числа N фотонов флуоресценции за время T накопления сигнала, полученного от M невзаимодействующих молекул.
2. Вычисление функций $w_N^M(T)$ для нескольких невзаимодействующих молекул различного типа (двухуровневых и трёхуровневых с триплетным состоянием) и выявление черт, позволяющих определить по виду функции $w_N^M(T)$, какому количеству индивидуальных молекул принадлежит излучение.
3. Вывод теоретического выражения для автокорреляционной функции $g^M(T)$ флуоресценции M невзаимодействующих молекул.
4. Вывод теоретического выражения для параметра Мандела $Q(t)$, характеризующего статистику фотонов излучения M молекул.
5. Теоретическое исследование вопроса, каким образом передача энергии электронного возбуждения от одной молекулы (донора) другой молекуле (акцептору) влияет на статистику фотонов излучения одиночной донор-акцепторной пары.

6. Построение с помощью техники Монте-Карло флуктуаций флуоресценции одиночной донор-акцепторной пары и исследование влияния скорости F передачи энергии на вид этих флуктуаций.
7. Вывод теоретических выражений для функции $w_N^{D,A}(T)$ распределения фотонов флуоресценции одиночной донор-акцепторной пары.
8. Нахождение формул для эффективности $E(F)$ передачи энергии в одиночной донор-акцепторной паре в зависимости от типа пары и скоростей всех возможных переходов в системе.

Следующие *положения* выносятся на защиту:

1. Выведенные в диссертации формулы для функций распределения различных типов, возникающих при статистической обработке флуктуаций флуоресценции M независимых излучателей, способны описать флуоресценцию ансамбля молекул.
2. Выведенные формулы описывают переход от квантового света одиночных молекул к классическому свету ансамбля невзаимодействующих молекул по мере увеличения числа молекул в ансамбле.
3. Выведенные формулы для функций распределения $w_N^{D,A}(T)$ фотонов флуоресценции донора, передающего энергию электронного возбуждения акцептору, и акцептора, принимающего энергию, способны описать распределение фотонов в треках флуктуирующих Д- и А-флуоресценций даже в случаях, когда донор и акцептор имеют нефлуоресцирующие «тёмные» состояния.
4. Нефлуоресцирующее состояние молекулы акцептора («тёмное» состояние) кардинально снижает эффективность передачи энергии.

Научная новизна результатов диссертации обусловлена тем, что в литературе, посвящённой статистике излучения молекулярных ансамблей, ранее не использовался наш подход, согласно которому формулы для функций распределения фотонов изучения нескольких молекул строились бы на основе формул для функций распределения фотонов, излучаемых одиночной молекулой.

Практическая значимость данной диссертационной работы состоит в том, что эффективные методы изучения квантовой динамики одиночных молекул распространены теперь на излучение молекулярных ансамблей. Это даёт, например, возможность изучения передачи энергии электронного возбуждения в одиночных донор-акцепторных парах по статистике фотонов флуоресценции таких пар, что имеет большое практическое значение при изучении проблемы передачи энергии электронного возбуждения в процессе фотосинтеза.

Вклад автора: решение уравнений динамики, а также все численные расчёты и расчёты методом Монте-Карло, доказывающие правильность представленных в диссертации формул для статистики фотонов флуоресценции молекулярных ансамблей и донор-акцепторных пар, были проведены исключительно автором диссертации.

Достоверность результатов диссертации подтверждается, во-первых, сравнением теории с анализом данных компьютерной симуляции, проведённой автором, во-вторых, сравнением с экспериментом.

Результаты диссертации прошли апробацию на международных и российских конференциях:

1. IX Международный Симпозиум по фотонному эху и когерентной спектроскопии (ФЭКС'2009), Казань, Россия, 2009,

2. XIII Международная молодёжная научная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия», Казань, Россия, 2009,
3. XIII Linz Winter Workshop, Линц, Австрия, 2011,
4. XVII International Workshop ««Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences», Берлин, Германия, 2011
5. 11th International Conference on Hole Burning, Single Molecule and Related Spectroscopies. Тюбинген, Германия, 2012,

а также на семинарах отдела молекулярной спектроскопии Института спектроскопии РАН и семинарах отдела люминесценции Физического института РАН им. П.Н. Лебедева.

Публикации

• статьи

1. И.С.Осадько, А.Л.Щукина, От квантового света одиночной молекулы к классическому свету ансамбля молекул // Опт. и спектр., т.109, №5. С. 832-838 (2010)
2. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina, Statistics of Molecular Ensemble Blinking Fluorescence // J. Phys. Chem. C, V. 114, №23. P. 10349–10358 (2010)
3. А.Л. Щукина, Распределение числа фотонов флуоресценции молекулярных комплексов // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Физ. матем. науки, т. 152, книга 3. С. 193-198 (2010)
4. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina, Influence of the energy transfer in a single donor–acceptor pair on the photon distribution functions in its fluorescence // Chem. Phys. Lett., V. 510, p. 257–260 (2011)
5. И.С. Осадько, А.Л. Щукина, Влияние передачи энергии от донора к акцептору на флуктуации донорной и акцепторной флуоресценции // Изв. РАН, Сер. Физ., т. 76, №3. С. 276-279 (2012)
6. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina, Blinking fluorescence of single donor-acceptor pairs: Important role of “dark” states in resonance energy transfer via singlet levels // Phys. Rev. E, V. 85. P. 061907 (2012)

• **тезисы**

1. А.Л. Щукина, Распределение числа фотонов флуоресценции молекулярных кластеров. Тезисы на XIII международную молодёжную научную школу «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия». 26-28 октября 2009, Казань, Россия.

2. И.С. Осадько, А.Л. Щукина, Статистика фотонов флуоресценции: от одиночной молекулы к ансамблю молекул. Тезисы на IX международный симпозиум по фотонному эху и когерентной спектроскопии. октября. 26-31 октября 2009, Казань, Россия.

3. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina. Fluctuations in single donor-acceptor pair fluorescence: a "dark" state in the donor molecule as a reason for blinking fluorescence of a two-level acceptor molecule. Тезисы на международную конференцию XIII Linz Winter Workshop. 4-7 февраля 2011, Линц, Австрия.

4. I.S. Osadko, A.L. Shchukina, Photon statistics of single donor-acceptor pair fluorescence as a new method for studying Förster Resonance Energy Transfer. Тезисы на международную конференцию «Single molecule spectroscopy and ultrasensitive analysis in the life sciences». 7-9 сентября, Берлин, Германия.

5. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina, Important Role of Donor and Acceptor "dark" States in FRET going via Singlet Levels in Single D-A pairs. Тезисы на 11 международную конференцию «Hole Burning, Single Molecule and Related Spectroscopies: Science and Applications». 27-30 августа 2009, Тюбинген, Германия.

Глава 1. Одиночные флуоресцирующие частицы

Флуоресценция одиночной частицы всегда флуктуирует. Флуктуации имеют место, так как процессы поглощения и испускания фотона всегда случайны и описываются вероятностными законами. Эти флуктуации позволяют извлечь информацию о квантовой динамике излучателя и его взаимодействии с локальным окружением.

Основным методом, применяемым в СОМ, является флуоресцентный метод, т.е. возбуждение молекулы непрерывным лазером. В первой главе будет дан обзор экспериментальных работ, использовавших этот метод для наблюдения излучения одиночных частиц, а также обзор особенностей спектров одиночных молекул.

1.1. Бесфононная линия и фононное крыло спектра одиночной молекулы

Структура спектра сложных молекул обусловлена электронными, колебательными, вращательными степенями свободы [3, 4]. Переход с изменением чисто электронной координаты при нахождении молекулы в основном колебательном состоянии как до, так и после перехода образует бесфононную линию спектра. Это узкая линия, имеющая высокую относительную интенсивность при низких температурах, когда электрон-фононное взаимодействие ослабевает [3]. Набор переходов с/на колебательно возбуждённые уровни образует фононное крыло спектра. Фононное крыло спектра поглощения развёрнуто в более коротковолновую сторону от бесфононной линии, а спектра флуоресценции – в более длинноволновую (см. рис.1).

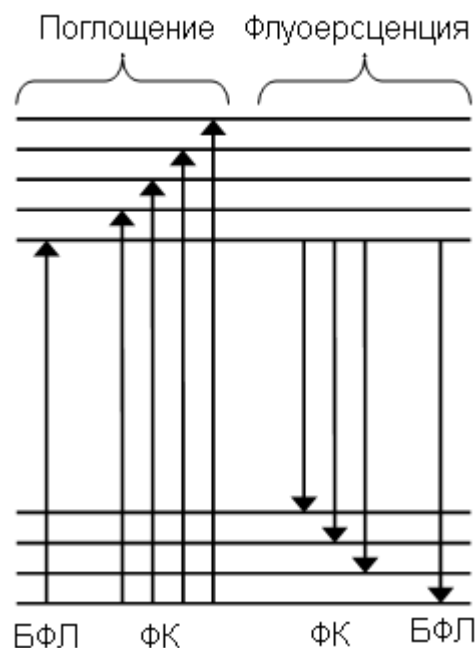


Рис. 1. Энергетическая схема электронно-колебательных переходов молекулы: переходы, образующие бесфононные линии (БФЛ) и фононные крылья (ФК) спектров поглощения и флуоресценции.

Таким образом, область флуоресценции молекулы спектрально сдвинута в более красную сторону от области поглощения, что известно как сдвиг Стокса [5].

1.2. Проблема неоднородного уширения оптических полос

При экспериментах с ансамблями одиночных молекул перед исследователями стояла острая проблема неоднородного уширения спектров [6]. Каждая из «идентичных» молекул в матрице имеет несколько разное локальное окружение. Разное межмолекулярное статическое взаимодействие приводит к сдвигу энергетических уровней и, соответственно, «смазыванию» структуры спектра ансамбля при перекрытии по-разному сдвинутых спектров отдельных молекул.

Устранить неоднородное уширение можно и в ансамблях, например, методами флуоресцентного сужения линий [3, 6] или выжигания спектральных провалов [3, 7]. Метод флуоресцентного сужения линий

основан на возбуждении молекул лазером с частотой в резонансной области ансамбля (области перекрытия спектров поглощения и флуоресценции). Молекулы, бесфононная линия которых совпадает с лазерной частотой, возбуждаются эффективнее молекул, для которых лазерная частота попадает в область фононного крыла. При этом при возбуждении в резонансную область число первых молекул в ансамбле больше, чем число вторых. Тогда в ансамбле возбуждённых молекул будут доминировать молекулы с бесфононной линией, совпадающей с лазерной частотой [3]. Такой ансамбль является почти однородным.

Второй метод, выжигания спектральных провалов, имеет следующую основу. Путём предварительного интенсивного облучения лазером часть молекул ансамбля «уводят» из основного состояния. В случае так называемых динамических спектральных провалов молекулы могут переходить в возбуждённое состояние (что приносит мало пользы, так как возбуждённые молекулы быстро, за время порядка 10^{-8} с флуоресцируют и возвращаются обратно в основное состояние) или в триплетное (время пребывания там на порядки дольше, что уже значительно полезнее). В случае стабильных спектральных провалов пользуются тем фактом, что молекула может потерять химическую стабильность в возбуждённом состоянии [3], а новая молекулярная форма (фотопродукт) будет поглощать на других частотах. Время жизни стабильного спектрального провала более суток, и он может быть «стёрт» нагреванием образца или облучением его белым светом, так как при этом преодолевается потенциальный барьер для возвращения в исходное состояние.

Примечательно, что то же явление, благодаря которому возможно выжигание спектральных провалов, может привести и к фотообесцвечиванию одиночных молекул [8].

Методы спектрального сужения линий и выжигания спектральных провалов были широко распространены до развития спектроскопии

одиноким молекулам. При исследовании одного излучателя проблема неоднородного уширения, естественно, полностью снята.

1.3. Спектроскопия одиночных частиц: проблемы и первые эксперименты

В СОМ обычно $10^4 - 10^{16}$ молекул попадает в зону облучения возбуждающим лазером [9]. Спектроскопия одиночных частиц с помощью селективных методов позволила убрать усреднения по огромному числу составляющих ансамбля и получить информацию о форме и положении спектральных линий отдельных частиц, а также о влиянии на спектры их взаимодействия с непосредственным локальным окружением. Первые работы в этой области выполнялись с одиночными атомами и ионами, и только затем удалось перейти к одиночным молекулам.

Первая проблема, с которой пришлось столкнуться исследователям одиночных излучателей, заключалась в сомнении относительно того, что интенсивность флуоресценции будет достаточна для регистрации. Однако эти сомнения оказались напрасными. В книге [4] приводится расчёт, согласно которому плотность потока фотонов от одиночной частицы при типичных значениях сечения поглощения красителя, мощности возбуждающего лазера и энергии фотонов составляет 750 фотонов в секунду. Человеческий глаз различает поток из 50 фотонов в секунду. Поэтому свечение одиночной частицы хорошо наблюдается глазом.

Впервые флуоресценцию одиночных атомов наблюдали Мандель и соавторы в работе [1]. Они впускали пучок атомов натрия малой концентрации в камеру, из которой был откачан воздух. Луч возбуждающего перестраиваемого по частоте лазера был направлен перпендикулярно направлению движения атомов. Каждый атом пролетал сквозь луч лазера практически по отдельности от других, за счёт чего и достигалась изоляция одиночных атомов. Отдельный атом находился в лазерном луче в течение порядка 200 нс и за это время успевал несколько раз перейти в возбуждённое

состояние и флуоресцировать [4]. Фотоэлектрические импульсы детектора фотонов обрабатывались затем статистически. Возникал вопрос: как показать, что зарегистрированные фотоны были испущены именно одиночным атомом? Одиночная флуоресцирующая частица не может испустить два фотона «подряд», т.е. с бесконечно малым временем задержки между ними. На повторное перевозбуждение и испускание фотона требуется некоторое время. Поэтому между фотонами одиночной частицы всегда будут временные интервалы некоторой длительности. Это явление получило название антигруппировка (antibunching, см. параграф 2.5 диссертации). Антигруппировка фотонов наблюдалась в работе [2], что свидетельствовало о том, что регистрируемая флуоресценция излучалась одним отдельным атомом.

Во флуоресценции одиночных ионов также наблюдали антигруппировку фотонов за несколько лет до спектроскопии одиночных молекул. Например, Итано и соавторы в работе [10] исследовали флуоресценцию одного и двух ионов Hg^+ и экспериментально установили, что антигруппировка фотонов двух одиночных частиц выражена меньше, чем одной (подробнее см. параграф 3.5 диссертации).

В первой работе [9] по спектроскопии одиночной молекулы в твёрдой матрице, опубликованной Моернером и Кадором в 1989 году, регистрировался спектр поглощения молекулы. В качестве одиночных молекул выступали примесные молекулы пентацена в паратерфениле. Эксперимент проводился при низкой температуре – 1.6 К – чтобы максимально увеличить относительную интенсивность бесфононной линии в спектре.

Зарегистрировать поглощение света одиночной молекулой «напрямую», т.е. по уменьшению интенсивности возбуждающего света, невозможно, так как уменьшение интенсивности возбуждающего света на один фотон пренебрежимо мало по сравнению с самой этой интенсивностью. Поэтому авторы использовали метод частотной модуляции возбуждающего света.

В последующих работах [11, 12] использовался упрощённый метод регистрации спектра поглощения одиночных молекул. На рис. 2 схематично представлен неоднородно уширенный спектр поглощения ансамбля молекул.

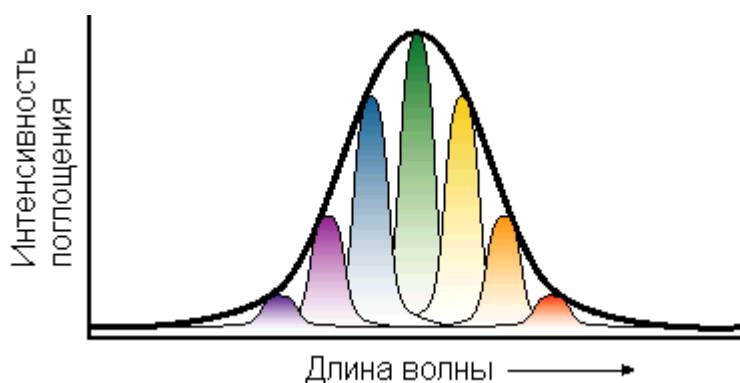


Рис. 2. Неоднородно уширенный спектр поглощения ансамбля молекул, состоящий из суммы однородных спектров поглощения отдельных молекул.

Спектры отдельных молекул, представленные цветными пиками на рис.2., сдвинуты друг относительно друга. Общий спектр ансамблей представляет собой сумму спектров отдельных молекул (широкий пик на рис.2). Число молекул, поглощающих ту или иную частоту, уменьшается при движении от центра распределения к краям.

Добиться столь малой концентрации примесей, чтобы в облучаемом лазером объёме находилась строго одна примесная молекула, сложно при том, что необходимо сохранить высокое отношение сигнал-шум [9]. В работах [11, 12] сигнал от одиночной молекулы пентацена получали путём выбора такой частоты возбуждающего лазера, чтобы она находилась в хвостах распределения рис.2. Как было сказано, чем дальше от центрального пика распределения, тем меньшее число молекул возбуждается такой частотой. Таким образом можно добиться того, чтобы возбуждалась и флуоресцировала только одна молекула.

Возбуждение осуществлялось в область бесфонной линии, однако при флуоресценции молекула может переходить на все электронно-колебательные уровни основного электронного состояния, благодаря чему в спектре флуоресценции всё равно наблюдается бесфонная линия и

фононное крыло, т.е. широкое распределение фотонов по частотам. Чтобы отделить при регистрации фотоны флуоресценции от фотонов возбуждающего лазера, необходимо поставить фильтр, не пропускающий фотоны возбуждающей частоты. При этом не будут регистрироваться и часть фотонов флуоресценции, однако интенсивность оставшихся, зарегистрированных фотонов будет пропорциональна вероятности возбуждения молекулы на той или иной возбуждающей частоте [4]. Таким образом и получали спектры поглощения одиночных молекул в работах [11, 12].

Одиночные флуоресцирующие объекты не исчерпываются атомами, ионами и молекулами. В последние годы активно исследуется флуоресценция квантовых точек, т.е. полупроводниковых нанокристаллов [13-19]. Электронный спектр идеальной квантовой точки представляет собой набор дискретных уровней, зависящих от размеров и формы нанокристалла – таким образом, частотами оптических переходов легко управлять. Также преимущество квантовых точек в том, что они демонстрируют высокую фотостабильность.

Квантовые точки, как и другие одиночные флуоресцирующие объекты (см. параграф 2.2.Б), зачастую имеют мерцающую флуоресценцию, т.е. при облучении непрерывным лазерным светом демонстрируют чередование так называемых on- и off-интервалов (интервалов с флуоресценцией и без неё). Если распределение случайных длительностей таких интервалов описывается экспоненциальной функцией в случае атомов и молекул (см. параграф 2.2.Б4), то для квантовых точек это распределение является степенным. К настоящему моменту было предложено несколько теорий, предлагающих объяснение такой зависимости [20-24], а также обзор [25], обсуждающий сильные и слабые стороны различных теорий.

1.4. Спектроскопия одиночных молекул при комнатных температурах: конфокальная микроскопия

Конфокальная микроскопия [26] позволила исследовать флуоресценцию одиночных молекул при комнатной температуре, что чрезвычайно важно при работе со сложными биологическими молекулами, которые не выдерживают низких температур. Её главное преимущество состоит в том, что такая схема позволяет отсеять свет, рассеянный от образца [4].

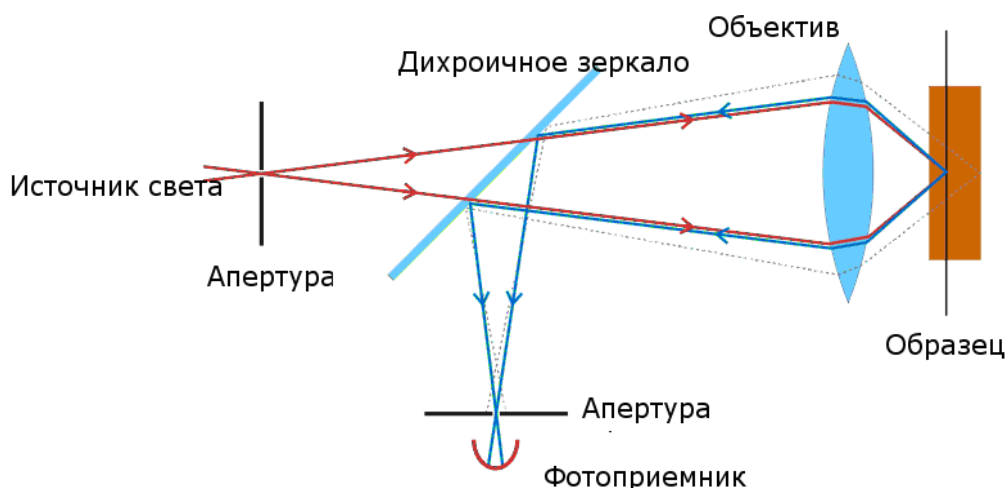


Рис. 3. Схема конфокального микроскопа. Рассеянный свет, идущий из глубины образца (пунктирные линии), отсекается апертурами.

В работе [27] с помощью конфокальной микроскопии регистрировали свободно диффундирующие молекулы в жидких растворителях при комнатных температурах. Наблюдалось неоднократное попадание исследуемой молекулы в лазерное пятно и выход из него. Кроме того, наблюдались мерцания флуоресценции (см. параграф 2.6 диссертации) молекул. Причём данные, по утверждению авторов, были получены в режиме реального времени, т.е. без учёта времени накопления сигнала, т.к. оно было мало.

В описанных выше работах регистрировались как квантовые траектории интенсивности флуоресценции, т.е. флуктуационные зависимости интенсивности от времени, так и средние интенсивности. Необходимо

подчеркнуть, что первые дают после статистической обработки больше информации, чем вторые. Например, функция $w_N(t)$ распределения числа N фотонов на времени t накопления сигнала даёт больше информации, чем её первый факториальный момент – средняя интенсивность:

$$\langle I \rangle = \frac{\langle N(t) \rangle}{t} = \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N w_N(t)}{t}. \quad (1.1)$$

Поэтому методы статистической обработки флуктуаций флуоресценции являются крайне важными инструментами СОМ.

В главе 2 будут подробно описаны методы корреляционной спектроскопии, разработанные в последние годы И.С. Осадько, позволяющие без затруднений, сопутствующих другим методам, рассчитать вероятности различного типа для флуоресценции одиночной молекулы. Затем в главе 3 будет показано, как в рамках данного диссертационного исследования эти методы были модифицированы для произвольного числа невзаимодействующих молекул.

Глава 2. Способы статистической обработки флуктуаций интенсивности флуоресценции одиночных молекул

2.1. Теория Манделя для статистики излучения

Л. Мандель в 1970-х годах построил теорию для статистики излучения фотонов, в которой фигурировали основные вероятностные функции, используемые далее в данной диссертационной работе.

Во-первых, статистика излучения определяется функцией распределения $w_N(T)$ числа N фотонов на временном интервале T , которая, согласно формуле Манделя, выражается следующим образом [28, 29]:

$$w_N(T) = \left\langle \left\langle \hat{T} : \frac{1}{N!} \left[\int_t^{t+T} dx \hat{I}(x) \right]^N \exp \left[- \int_t^{t+T} dx \hat{I}(x) \right] : \right\rangle \right\rangle. \quad (2.1)$$

Эта формула представляет собой квантово-статистическое среднее от упорядоченного во времени нормального произведения операторов $\hat{I}(x)$ интенсивности электромагнитного поля. Она пригодна как для флуоресценции ансамбля молекул, так и для флуоресценции одиночной молекулы.

Во-вторых, статистику излучения можно описывать автокорреляционной функцией (АФ) флуоресценции. АФ второго порядка определяется следующим образом [28, 29]:

$$g^{(2)}(T) = \frac{\langle I(t)I(t+T) \rangle}{\langle I(t)I(t+\infty) \rangle} = \frac{\langle I(t)I(t+T) \rangle}{\langle I \rangle^2}, \quad (2.2)$$

где $I(t) = N/t$ - интенсивность флуоресценции, т.е. число N фотонов в единицу времени t . АФ (2.2) может быть измерена экспериментально. Числитель формулы (2.2) представляет собой сумму всех перекрывающихся произведений двух сдвинутых на время T флуктуирующих интенсивностей флуоресценции, а $\langle I \rangle$ есть средняя интенсивность флуоресценции.

В-третьих, параметр Манделя Q характеризует отклонение распределения фотонов от пуассоновского. Он зависит от первого и второго факториального момента распределения фотонов и имеет следующий вид:

$$Q = \frac{\langle N(N-1) \rangle - \langle N \rangle^2}{\langle N \rangle} \quad (2.3)$$

Известно, что при $Q=0$ распределение фотонов пуассоновское. Если $Q < 0$, то распределение фотонов уже пуассоновского, т.е. субпуассоновское. Если же $Q > 0$, то распределение фотонов шире пуассоновского, т.е. суперпуассоновское. Параметр Манделя необходимо было ввести в рассмотрение, так как формула (2.1) для распределения числа фотонов не позволяет во многих случаях произвести численный расчёт. С помощью же параметра Манделя появлялась возможность сделать вывод о форме распределения.

Теория Манделя описывала экспериментально наблюдаемые величины, но при этом опиралась только на закономерности излучения фотонов вне их связи с микроскопической моделью излучателей. Однако зависимости АФ от времени «задержки» и распределения фотонов от времени накопления сигнала определяются динамикой квантовых прыжков между основным электронным состоянием 0 и возбуждённым электронным состоянием 1 каждой молекулы, т.е. микроскопической моделью молекулярного ансамбля или одиночных молекул. Поэтому необходимы были формулы, связывающие упомянутые вероятности с микроскопической моделью излучателей. Эти формулы позволили бы проводить сравнение измеренной и рассчитанной АФ.

Такие формулы были найдены И.С. Осадько в работах [3, 4, 30, 31]. В отличие от формул Манделя, они позволяют сделать численный расчёт во многих случаях. Метод, разработанный в этих работах, будет описан в последующих параграфах главы 2.

2.2. Флуктуации интенсивности флуоресценции одиночной молекулы

А. Двухуровневая молекула

На рис. 4 представлена схема простейшей флуоресцирующей частицы (молекулы, атома, иона) – двухуровневой, которая совершает переходы только между основным (0) и первым возбуждённым (1) состоянием.

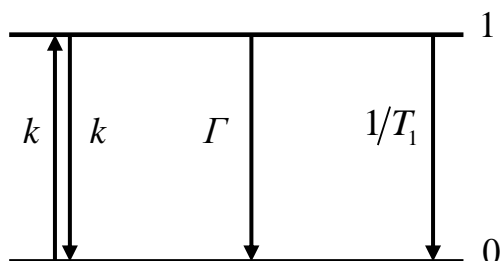


Рис. 4. Двухуровневая частица, совершающая переходы между основным состоянием 0 и первым возбуждённым 1.

Здесь k – скорость поглощения фотонов лазера и спонтанной флуоресценции, Γ – скорость безызлучательных переходов, $1/T_1$ – скорость спонтанной флуоресценции. Так как обычно справедливо соотношение $1/T_1 \ll k, \Gamma$, то скорость спонтанной флуоресценции, определяет скорость перехода в основное состояние 0 из возбуждённого 1.

Когда двухуровневую молекулу облучают постоянным лазером накачки, она поглощает фотоны лазерного излучения с переходом $0 \rightarrow 1$ и испускает фотоны флуоресценции с переходом $1 \rightarrow 0$ в случайные моменты времени. Таким образом, если поделить временную ось на интервалы накопления сигнала (bin time), на каждом из таких интервалов будет зарегистрировано разное число фотонов флуоресценции (см. рис.5).



Рис.5. Последовательность фотонов флуоресценции двухуровневой молекулы на временной оси. На каждом интервале накопления сигнала T излучается разное число фотонов.

Это число фотонов будет случайным для каждого интервала, т.е. будет флуктуировать. Такие флуктуации интенсивности флуоресценции являются характерными для одиночных излучателей. Они присутствуют даже в рамках простейшей модели – двухуровневой излучающей молекулы. Эти флуктуации могут быть статистически обработаны различными способами, в результате чего можно получить информацию о квантовой динамике частицы. Кроме того, располагая данными о различного рода вероятностях, полученных после обработки экспериментальных данных, можно убедиться, действительно ли был зарегистрирован сигнал только одной молекулы.

A1. Старт-стоп коррелятор

В работах [30-33] для описания флуктуирующей флуоресценции вводится функция, называемая старт-стоп коррелятором. Физический смысл старт-стоп коррелятора определяется следующей формулой:

$$dW_s(t) = s(t)dt, \quad (2.4)$$

в которой $dW_s(t)$ есть вероятность наблюдать второй фотон флуоресценции во временном интервале $(t, t + dt)$, если предшествующий фотон был испущен при $t=0$. Таким образом, старт-стоп коррелятор является плотностью вероятности обнаружить два последовательно испущенных фотона, разделенных временным интервалом t . Поэтому $s(t)$ также называют “waiting

time distribution” [32-34]. Конкретный вид коррелятора старт-стоп определяется микроскопической моделью одиночного излучателя фотонов.

Величина

$$\tau_0 = \int_0^{\infty} ts(t)dt \quad (2.5)$$

является средней длительностью интервала между двумя последовательно испущенными фотонами. Эта длительность является обратной величиной по отношению к средней интенсивности флуоресценции:

$$\frac{1}{\tau_0} = \langle I \rangle. \quad (2.6)$$

Старт-стоп коррелятор можно найти, пользуясь балансными уравнениями для населённостей энергетических уровней излучающей системы. Для двухуровневой молекулы, схема которой представлена на рис.4, эти балансные уравнения выглядят следующим образом [35]:

$$\begin{aligned} \dot{\rho}_0 &= -k\rho_0 + (k + \Gamma + 1/T_1)\rho_1, \\ \dot{\rho}_1 &= k\rho_0 - (k + \Gamma + 1/T_1)\rho_1. \end{aligned} \quad (2.7)$$

Здесь ρ_0 и ρ_1 - населённости основного состояния и первого возбуждённого, константы переходов определены в пояснениях к рис.4. Для системы (2.7) выполняется равенство $\sum_i \dot{\rho}_i = 0$. Это так называемая закрытая система, в которой полная вероятность нахождения в том или ином состоянии постоянна и равна единице.

Чтобы рассчитать распределение числа фотонов, необходимо перейти от такой закрытой системы к открытой, не учитывающей возвращения молекулы в первоначальное основное состояние после испускания фотона. Такой переход осуществляется в общем случае с помощью отбрасывания соответствующих членов из уравнений типа (2.7). В данном случае это член $+\rho_1/T_1$ в первом уравнении (2.7). Уравнения, описывающие открытую систему, имеют вид [35]

$$\begin{aligned} \dot{W}_0 &= -kW_0 + (k + \Gamma)W_1, \\ \dot{W}_1 &= kW_0 - (k + \Gamma + 1/T_1)W_1. \end{aligned} \quad (2.8)$$

В открытой системе, описываемой уравнениями (2.8), полная вероятность $\sum_i \dot{W}_i$ нахождения в каком-либо состоянии не сохраняется: $\sum_i \dot{W}_i = -W_1/T_1 \neq 0$. Эта сумма описывает уход из открытой системы, т.е. излучение фотона флуоресценции. Более строго, эта сумма, взятая с обратным знаком, равна старт-стоп коррелятору $s(t)$, т.е. плотности испускания фотона в момент времени t :

$$s(t) = -\sum_i \dot{W}_i. \quad (2.9)$$

Как было показано в работе [37], старт-стоп коррелятор двухуровневой молекулы описывается выражением

$$s(T) = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} [\exp(-\lambda_1 T) - \exp(-\lambda_2 T)], \quad (2.10)$$

или, для лапласовских компонент (что будет необходимо ниже),

$$s(\lambda) = \frac{\lambda_1}{\lambda_1 - \lambda} \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda}, \quad (2.11)$$

где $\lambda_1 = \gamma - R$, $\lambda_2 = \gamma + R$, $\gamma = k + (\Gamma + 1/T_1)/2$, $R = \sqrt{\gamma^2 - k/T_1}$. Здесь Γ – скорость безызлучательных переходов из возбуждённого состояния молекулы, $1/T_1$ – скорость спонтанной флуоресценции, а k – скорость возбуждения молекулы светом лазера (в соответствии с рис.4).

Типичный вид старт-стоп коррелятора $s(t)$ одиночной двухуровневой молекулы представлен на рис.6.

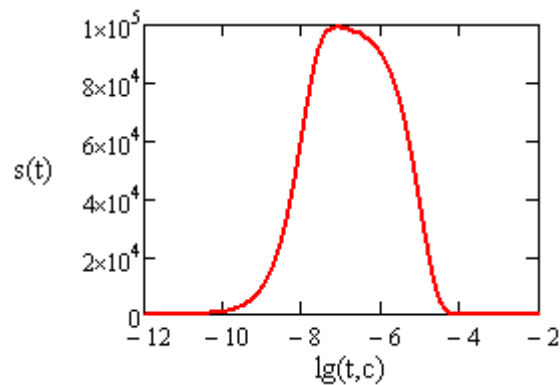


Рис.6. Старт-стоп коррелятор одиночной двухуровневой молекулы.

$$k = 10^5 \text{ c}^{-1}, 1/T_1 = 10^8 \text{ c}^{-1}, \Gamma = 10^3 \text{ c}^{-1}.$$

Такой вид графика обусловлен биэкспоненциальным выражением (2.10) для $s(t)$. При малых временах коррелятор $s(t)$ стремится к нулю, так как вероятность, что молекула испустит второй фотон «мгновенно» после первого, стремится к нулю. Это явление – антигруппировка (antibunching) фотонов – является характерным для одиночных излучателей. Молекуле требуется время на перевозбуждение и дальнейшее испускание фотона флуоресценции. Вторая экспонента в выражении (2.10) обуславливает нарастание при $t \sim 10^{-8}$. Что касается спада графика на рис.6 при $t \sim 10^{-5}$, он обусловлен первой экспонентой в выражении (2.10). Константы λ_1 и λ_2 близки по значениям к константам k и $1/T_1$. Площадь под график рис.6 равна единице, так как старт-стоп коррелятор $s(t)$ – это плотность вероятности обнаружить второй фотон, испущенный через промежуток времени t после первого, а значит

$$\int_0^{\infty} s(t) dt = 1. \quad (2.12)$$

A2. Распределение числа фотонов

С помощью старт-стоп коррелятора можно найти распределение $w_N(t)$ числа N фотонов на интервале накопления сигнала t для флуоресценции одиночной молекулы, возбуждаемой непрерывным светом. Лапласовский образ функции распределения $w_N(\lambda)$ описывается следующей формулой [30-33]:

$$w_N(\lambda) = \frac{[1 - s(\lambda)]s(\lambda)^{N-1}}{\tau_0 \lambda^2}, \quad (2.13)$$

где $s(\lambda)$ – ласпласовский образ старт-стоп коррелятора. Переход с помощью обратного преобразования Лапласа к временным компонентам даёт следующую формулу для распределения числа фотонов, выведенную в работе [30]:

$$w_N(T) = \frac{1}{\tau_0} \int_0^T (T-t) \left\{ [s^{N-1}(\lambda)]_t - 2[s^N(\lambda)]_t + [s^{N+1}(\lambda)]_t \right\} dt \quad \text{при } N \geq 1, \quad (2.14)$$

$$w_0(T) = \frac{1}{\tau_0} \int_0^\infty \left[1 - \int_0^{T+t} s(x) dx \right] dt,$$

где τ_0 – среднее время между двумя последовательно испущенными фотонами, определяемое формулой:

$$\tau_0 = \int_0^\infty ts(t) dt. \quad (2.15)$$

Квадратные скобки с индексом t означают обратный переход к временным компонентам после возведения лапласовских образов в степень.

Таким образом, вычислив старт-стоп коррелятор $s(t)$ с помощью балансных уравнений (2.8) или подобных им, можно найти функцию распределения $w_N(t)$ числа N фотонов на времени t накопления сигнала. Однако старт-стоп коррелятор несёт важную информацию и сам по себе. В частности, на сегодняшний день имеется возможность регистрации каждого отдельного фотона флуоресценции. Значит, возможно провести статистическую обработку временных отрезков, разделяющих последовательно испущенные фотоны, и сопоставить результаты с теоретически рассчитанными старт-стоп корреляторами.

Формула (2.14), выведенная И.С. Осадько, позволяет рассчитывать распределения $w_N(t)$ числа N фотонов без применения N -кратного интегрирования, как в других методах (см., например, [32]).

Распределение числа фотонов является одной из важнейших характеристик флуоресценции частицы. Расчет распределения числа фотонов для двухуровневой молекулы осуществляется с использованием универсальной формулы (2.14) следующим образом.

Совершая в формуле (2.10) преобразование Лапласа и возводя результат в степень N , приходим к следующему выражению [37]:

$$s(\lambda)^N = \lambda_1 \lambda_2 \frac{\lambda_1^{N-1}}{(\lambda_1 - \lambda)^N} \frac{\lambda_2^{N-1}}{(\lambda_2 - \lambda)^N} = \lambda_1 \lambda_2 P_{N-1}^{\lambda_1}(\lambda) P_{N-1}^{\lambda_2}(\lambda), \quad N \geq 1. \quad (2.16)$$

Здесь $P_N^{\lambda_i}(\lambda) = \lambda_i^N / (\lambda_i - \lambda)^{N+1}$ есть лапласовский образ пуассоновской функции. Совершая в этой формуле переход к временной компоненте, приходим к следующему выражению:

$$[s(\lambda)^N]_t = \lambda_1 \lambda_2 \int_0^t dx P_{N-1}[\lambda_1(t-x)] P_{N-1}[\lambda_2 x]. \quad (2.17)$$

Здесь $P[ax] = (ax)^N \exp(-ax) / N!$ – функция Пуассона. Подставляя формулу (2.17) в формулу (2.14), можно вычислить распределение фотонов флуоресценции двухуровневой молекулы. Результат изображен на Рис.7 сплошной линией.

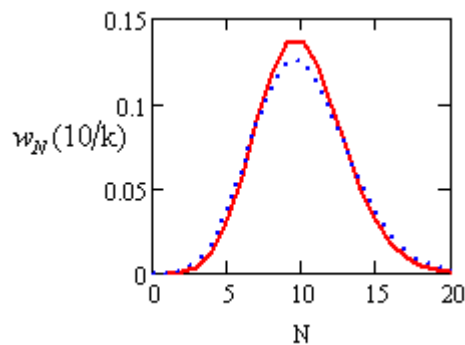


Рис. 7. Распределение числа N фотонов при $I/T_1 = 10/k$ на временном интервале $t = 10/k$ (сплошная линия) и пуассоновское распределение с тем же максимумом (точки).

Распределение $w_N(t)$ числа N фотонов на времени t накопления сигнала по форме близко к пуассоновскому, но уже его – оно является субпуассоновским. Пуассоновское распределение с тем же положением максимума представлено на Рис.7 точками. Чем больше разница между скоростью k поглощения фотонов лазера и скоростью I/T_1 флуоресценции молекулы, тем ближе форма распределения к пуассоновкой. При скорости k , меньшей скорости I/T_1 на два-три порядка, что является обычным для экспериментов, форма распределения становится очень близка к пуассоновской [37].

А3. Полный двухфотонный коррелятор

Помимо старт-стоп коррелятора, флуктуации флуоресценции могут описываться и другим типом коррелятора – полным двухфотонным. Полный двухфотонный коррелятор $p(t)$ определяется в соответствие с формулой

$$dW_p(t) = p(t)dt, \quad (2.18)$$

в которой $dW_p(t)$ есть вероятность наблюдать два фотона, разделённых временным интервалом t при любом количестве фотонов, дополнительно испущенных на этом интервале. Отличие старт-стоп и полного двухфотонного коррелятора в том, что первый учитывает два последовательно испущенных фотона, в то время как для второго возможно любое число промежуточных фотонов между рассматриваемыми.

Как было подробно показано И.С. Осадько в [3, 35], полный коррелятор и коррелятор старт-стоп связаны следующим интегральным соотношением:

$$p(t) = s(t) + \int_0^t s(t-x)p(x)dx. \quad (2.19)$$

Для лапласовских компонент справедливо следующее соотношение:

$$\frac{s(\lambda)}{1-s(\lambda)} = p(\lambda). \quad (2.20)$$

Лапласовская компонента старт-стоп коррелятора одиночной двухуровневой молекулы выражается формулой (2.11). На основании выражения для старт-стоп коррелятора и формулы (2.20), полный двухфотонный коррелятор одиночной двухуровневой молекулы, после перехода к временным компонентам, имеет следующий вид [37]:

$$p(t) = \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2} [1 - \exp(-(\lambda_1 + \lambda_2)t)] \quad (2.21)$$

Типичный вид графика полного двухфотонного коррелятора (2.21) одиночной двухуровневой молекулы представлен на рис.8.

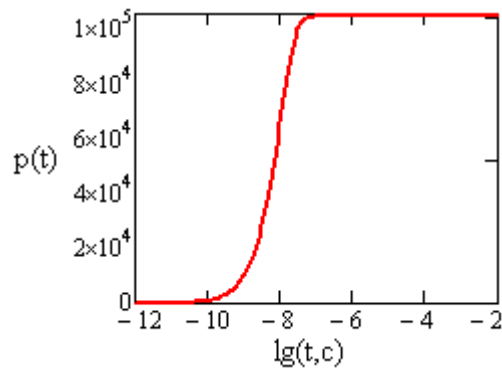


Рис.8. Полный двухфотонный коррелятор одиночной двухуровневой молекулы.

$$k = 10^5 \text{ c}^{-1}, 1/T_1 = 10^8 \text{ c}^{-1}, \Gamma = 10^3 \text{ c}^{-1}.$$

При малых временах наблюдается тот же эффект антигруппировки фотонов, что и на графике старт-стоп коррелятора на рис.6. При больших временах полный двухфотонный коррелятор перестаёт зависеть от времени и становится численно равен средней интенсивности флуоресценции. Этот факт свидетельствует о том, что корреляция между двумя фотонами, разделёнными большими временами, пропадает, если между ними могло быть испущено сколько угодно промежуточных фотонов (случай полного двухфотонного коррелятора). Тогда $dW_p(\infty) = p(\infty)dt = \langle I \rangle dt$, т.е. вероятность наблюдать фотон в интервале $(t, t + dt)$ определяется средней интенсивностью свечения, умноженной на длительность временного интервала. То есть справедливо равенство

$$\langle I \rangle = p(\infty). \quad (2.22)$$

А4. Автокорреляционная функция флуоресценции

АФ флуоресценции может быть выражена через полный двухфотонный коррелятор [36]. Ниже будет описан метод, позволяющий получить это выражение.

Второй факториальный момент функции распределения, заданной формулой Манделя (2.1), равен

$$\begin{aligned}
\langle N^{(2)}(T) \rangle &= \sum_{N=0}^{\infty} N(N-1)w_N(T) = \int_t^{t+T} dt_2 \int_t^{t+T} dt_1 \langle \langle \hat{T} : \hat{I}(t_1)\hat{I}(t_2) : \rangle \rangle = \\
2 \int_0^T dx \int_0^x dy \langle \langle \hat{I}(x)\hat{I}(y) : \rangle \rangle &= 2 \langle I \rangle^2 \int_0^T dx \int_0^x dy g^{(2)}(x-y).
\end{aligned} \tag{2.23}$$

После преобразование Лапласа $f(\lambda) = \int_0^{\infty} f(t)e^{i(\omega+i0)t} dt$ обеих частей формулы (2.23) она принимает вид

$$\langle N^{(2)}(\lambda) \rangle = 2 \langle I \rangle^2 g^{(2)}(\lambda) / \lambda^2 \tag{2.24}$$

Обратимся теперь ко второму факториальному моменту функции распределения $w_N(T)$, чей лапласовский образ определён формулой (2.13).

Используя лапласовские компоненты, получаем

$$\langle N^{(2)}(\lambda) \rangle = \sum_{N=0}^{\infty} N(N-1)w_N(\lambda) = \frac{[1-s(\lambda)]^2}{\tau_0 \lambda^2} \sum_{N=0}^{\infty} N(N-1)s(\lambda)^{N-1} = \frac{2s(\lambda)}{\tau_0 \lambda^2 [1-s(\lambda)]}. \tag{2.25}$$

Подстановка полного двухфотонного коррелятора (2.20) в выражение (2.25) даёт следующий результат:

$$\langle N^{(2)}(\lambda) \rangle = \frac{2p(\lambda)}{\tau_0 \lambda^2} = 2 \langle I \rangle p(\lambda) / \lambda^2. \tag{2.26}$$

Приравнивание правых частей формул (2.24) и (2.26) приводит к следующему выражению для лапласовского образа АФ флуоресценции [36]:

$$g^{(2)}(\lambda) = p(\lambda) / \langle I \rangle \tag{2.27}$$

С учётом формулы (2.22) и после совершения в выражении (2.27) перехода к функциям времени, АФ может быть представлена в виде [36]

$$g^{(2)}(T) = p(T) / p(\infty). \tag{2.28}$$

Таким образом АФ флуоресценции, измеряемая в опыте, выражается через полный двухфотонный коррелятор, рассчитываемый при заданной микроскопической модели одиночного излучателя. Форма АФ повторяет форму полного двухфотонного коррелятора, отличаясь от него лишь в $\langle I \rangle = p(\infty)$ раз. АФ нормирована на единицу на бесконечности. Очевидно, что те же черты (антигруппировка фотонов и отсутствие корреляции между

произвольными фотонами, разделёнными большими временами) проявляются и в АФ.

Двухуровневая схема является простейшей моделью флуоресцирующей молекулы. Флуоресценция такой молекулы непрерывна. Однако во многих случаях исследователи сталкиваются с более сложным, мерцающим характером флуоресценции, для описания которого необходимо использовать трёхуровневую модель.

Б. Трёхуровневая молекула

Флуоресценция большинства органических молекул, возбуждаемая непрерывным светом, имеет мерцающий характер, т.е. временные интервалы с флуоресценцией (on-интервалы) прерываются паузами без света флуоресценции (off-интервалами). Такой характер флуоресценции обусловлен тем, что в структуре энергетических уровней молекулы имеется «тёмное» нефлуоресцирующее состояние. Оно может быть различной природы. Часто в органических молекулах между основным и первым возбуждённым синглетным уровнем расположен триплетный уровень, как показывает рис.9.

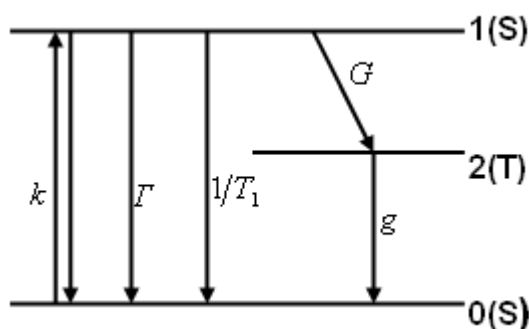


Рис.9. Энергетическая схема молекулы с триплетным уровнем, имеющей мерцающую флуоресценцию.

Здесь скорости k , Γ и $1/T_1$ имеют тот же смысл, что и в случае двухуровневой молекулы (см. пояснения к рис.4). Молекула прыгает с основного уровня 0 на возбуждённый уровень 1 и обратно, поглощая фотоны лазерного света и

спонтанно испуская фотоны флуоресценции. Однако если вероятность синглет-триплетного перехода G не очень мала, то молекула может прыгнуть в триплетное состояние 2. После попадания молекулы в триплетное состояние поглощение лазерного света и, следовательно, флуоресценция прекращаются. После скачка молекулы (со скоростью g) в основное синглетное состояние 0 флуоресценция восстанавливается. Поэтому флуоресценция молекулы имеет мерцающий характер, т.е. интервалы со светом перемежаются интервалами без света. Последовательность фотонов мерцающей флуоресценции трёхуровневой молекулы представлена на рис.10.



Рис. 10. Последовательность фотонов мерцающей флуоресценции трёхуровневой молекулы.

Однако необходимо подчеркнуть, что закономерности мерцающей флуоресценции, описываемые далее, не зависят от природы тёмного состояния.

Б1. Старт-стоп коррелятор

Балансные уравнения для трёхуровневой молекулы выглядят следующим образом:

$$\begin{aligned}
 \dot{\rho}_0 &= -k\rho_0 + (\Gamma + k + 1/T_1)\rho_1 + g\rho_2 \\
 \dot{\rho}_1 &= k\rho_0 - (\Gamma + k + 1/T_1 + G)\rho_1 \\
 \dot{\rho}_2 &= G\rho_1 - g\rho_2
 \end{aligned}
 \tag{2.29}$$

Это уравнения для закрытой системы, равенство $\sum_i \dot{\rho}_i = 0$ выполняется.

Флуоресценция осуществляется с уровня 1 на уровень 0, поэтому, чтобы

перейти к уравнениям для нахождения старт-стоп коррелятора, необходимо отбросить член $+\rho_1/T_1$ в первом уравнении (2.29). Тогда приходим к уравнениям для открытой системы

$$\begin{aligned}\dot{W}_0 &= -kW_0 + (\Gamma + k)W_1 + gW_2 \\ \dot{W}_1 &= kW_0 - (\Gamma + k + 1/T_1 + G)W_1, \\ \dot{W}_2 &= GW_1 - gW_2\end{aligned}\quad (2.30)$$

с помощью которых можно найти старт-стоп коррелятор $s(t)$ флуоресценции трёхуровневой молекулы. Старт-стоп коррелятор определяется выражением (2.9) и в данном случае равен $s(t) = -\sum_i \dot{W}_i = W_1/T_1$.

Как было показано в работе [37], старт-стоп коррелятор трёхуровневой молекулы описывается суммой трёх экспонент

$$s(t) = \sum_{j=0}^2 s_j \exp(-\lambda_j t), \quad (2.31)$$

где показатели экспонент $\lambda_0, \lambda_1, \lambda_2$ – корни определителя системы (2.30) в переходе к лапласовским образам:

$$\begin{vmatrix} \lambda - k & \Gamma + k & g \\ k & \lambda - \Gamma - k - 1/T_1 - G & 0 \\ 0 & G & \lambda - g \end{vmatrix} = 0, \quad (2.32)$$

зависящие от скоростей переходов между уровнями, причём $\lambda_0 \ll g$, $\lambda_1 \ll k$, $\lambda_2 \ll 1/T_1$.

Типичный вид старт-стоп коррелятора мерцающей флуоресценции представлен на рис.11.

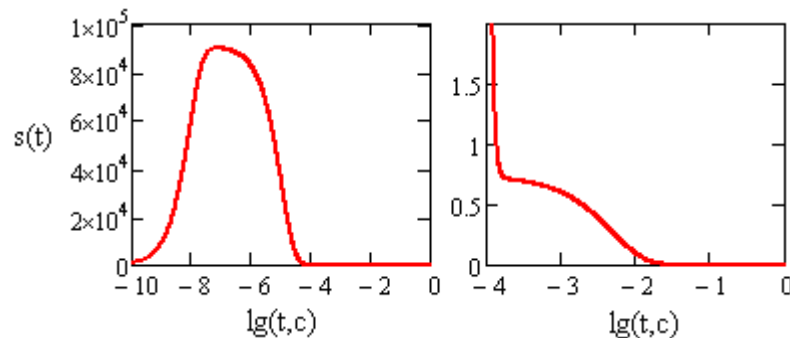


Рис.11. Старт-стоп коррелятор одиночной трёхуровневой молекулы с параметрами (2.33).

Скорости перехода между энергетическими уровнями молекулы, старт-стоп коррелятор которой представлен на рис.11, следующие:

$$k = 10^5 c^{-1}, 1/T_1 = 10^8 c^{-1}, \Gamma = 10^7 c^{-1}, G = 3.7 \cdot 10^5 c^{-1}, g = 200 c^{-1}. \quad (2.33)$$

Такой вид старт-стоп коррелятора определяется тремя экспонентами, согласно (2.31). Справа на рис.11 показан участок, обусловленный экспонентой $\exp(-\lambda_0 t)$, где $\lambda_0 \sim g$. Этим участком старт-стоп коррелятор трёхуровневой молекулы и отличается от старт-стоп коррелятора двухуровневой молекулы. Этот хвост старт-стоп коррелятора, простирающийся в область больших времён, является характерным признаком мерцающей флуоресценции.

Б2. Распределение числа фотонов

Зная выражение для старт-стоп коррелятора, можно рассчитать функцию распределения $w_N(t)$ числа N фотонов на времени t накопления сигнала, пользуясь формулой (2.14). Временная компонента N -ой степени лапласовского образа коррелятора старт-стоп имеет следующий вид [30]:

$$[s(\lambda)^N]_t = \lambda_1 \lambda_2 \left(\frac{\lambda_0}{a} \right)^N \left\{ \int_0^t dx P_{N-1}[\lambda_1(t-x)] P_{N-1}[\lambda_2 x] + \right. \\ \left. + \lambda_0 \sum_{m=1}^N C_N^m \left(\frac{a - \lambda_0}{\lambda_0} \right)^m \int_0^t dx P_{m-1}[\lambda_0(t-x)] \int_0^x dy P_{N-1}[\lambda_1(x-y)] P_{N-1}[\lambda_2 y] \right\}. \quad (2.34)$$

Распределение числа фотонов для мерцающей флуоресценции имеет вид, подобный графику на рис. 12.

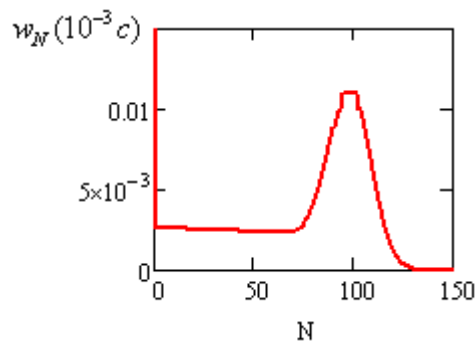


Рис.12. Распределение числа N фотонов трёхуровневой молекулы с параметрами (2.33) на времени накопления сигнала 10^{-3} с. $w_0(10^{-3} c) = 0.515$.

Распределение фотонов $w_M(t)$ мерцающей флуоресценции, представленное на рис.12, состоит из трёх частей: пика при $N \sim 100$, подобного распределению фотонов немерцающей флуоресценции двухуровневой молекулы (рис.7); пологого плеча при малых N и бесфотонной вероятности $w_0(t)$. Пик распределения объясняется возможностью попадания интервала наблюдения целиком на один on-интервал мерцающей флуоресценции. Плечо объясняется тем, что интервал наблюдения может частично покрывать on-интервалы и частично off-интервалы.

Б3. Полный двухфотонный коррелятор и автокорреляционная функция

В работе [35] было показано, что полный двухфотонный коррелятор можно найти, зная населённость уровня, при переходе с которого осуществляется флуоресценция:

$$p(t) = \frac{\rho_1(t)}{T_1}. \quad (2.35)$$

Решая систему уравнений (2.29) для населённостей энергетических уровней трёхуровневой молекулы и подставляя решение в выражение (2.35), приходим к следующему выражению для полного двухфотонного коррелятора мерцающей флуоресценции:

$$p(t) = \frac{k}{T_1} \left[\frac{g}{\gamma_0^2 - R^2} + \left(1 - \frac{g}{\gamma_0 - R} \right) \frac{e^{-(\gamma_0 - R)t}}{2R} - \left(1 - \frac{g}{\gamma_0 + R} \right) \frac{e^{-(\gamma_0 + R)t}}{2R} \right] \quad (2.36)$$

$$\text{где } \gamma_0 = \frac{2/T_1 + 2k + \Gamma + G + g}{2}, \quad R = \sqrt{\left(\frac{2/T_1 + 2k + \Gamma + G - g}{2} \right)^2 - kG}.$$

Типичный вид полного двухфотонного коррелятора представлен на рис.13.

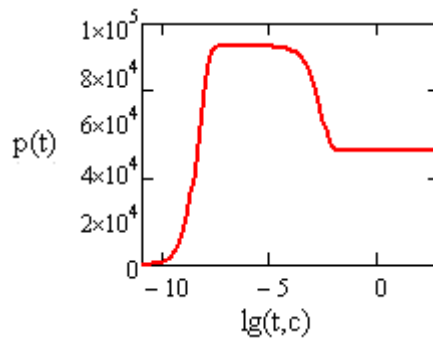


Рис.13. Полный двухфотонный коррелятор
одиночной трёхуровневой молекулы с параметрами (2.33).

График полного двухфотонного коррелятора демонстрирует антигруппировку фотонов ($p(t)$ стремится к нулю при малых временах t), так же, как и график полного двухфотонного коррелятора для двухуровневой молекулы (рис.8). Однако для трёхуровневой молекулы появляется и новая черта: группировка фотонов (bunching). На рис. 13 она проявляется в том, что график «поднимается» на временах $\sim 10^{-5}$ с. Такая характерная «ступенька» на графике АФ появляется, когда фотоны излучаются «группами» внутри оп-интервалов, разделённых промежутками (off-интервалами). Таким образом, по виду графика АФ можно определить, является ли флуоресценция мерцающей.

Полный двухфотонный коррелятор и АФ флуоресценции связаны соотношением (2.28), а значит, отличаются лишь на константу. В экспериментально наблюдаемой АФ флуоресценции одиночных молекул с тёмным состоянием проявляются те же черты: группировка и антигруппировка фотонов.

Б4. Распределение on- и off-интервалов

Длительности on- и off-состояний трёхуровневой молекулы распределены случайным образом. Способ нахождения этих распределений был предложен И.С. Осадько в книге [3].

Балансные уравнения (2.29) описывают динамику населённости энергетических уровней трёхуровневой молекулы.

Уравнения для оп-состояний. Эти уравнения можно найти с помощью системы (2.29), если во втором уравнении отбросить член $g\rho_2$, описывающий приход молекулы в синглетное состояние из триплетного. Следующая система уравнений описывает динамику оп-состояний:

$$\begin{aligned}\dot{\rho}_0 &= -k\rho_0 + (\Gamma + k + 1/T_1)\rho_1, \\ \dot{\rho}_1 &= k\rho_0 - (\Gamma + k + 1/T_1 + G)\rho_1.\end{aligned}\quad (2.37)$$

Функция $\rho_{on} = \rho_1 + \rho_0$, т.е. вероятность пребывания молекулы в синглетном состоянии, найденная из этих двух уравнений при начальном условии $\rho_0(0) = 1$, $\rho_1(0) = \rho_2(0) = 0$ и нормированная интегрально на единицу, будет описывать распределение оп-интервалов по длительности [3]. Складывая два уравнения системы (2.37), находим

$$\dot{\rho}_{on} = -G\rho_1. \quad (2.38)$$

При временах накопления фотонов, существенно превышающих средний интервал между двумя испущенными фотонами, флуоресценция, испускаемая на оп-интервале, будет восприниматься как непрерывное свечение. В этом случае можно воспользоваться квазистационарным приближением, положив $\dot{\rho}_1 = 0$ [3]. Тогда из первого уравнения системы (2.37) следует связь:

$$\rho_1 = \frac{kT_1}{1 + (k + \Gamma + G)T_1} \rho_0. \quad (2.39)$$

Используя эту формулу и формулу (2.38), можно выразить ρ_1 через ρ_{on} :

$$\rho_1 = \frac{kT_1}{1 + (2k + G + \Gamma)T_1} \rho_{on} \quad (2.40)$$

Результат подстановки этой формулы в уравнение (2.38) приводит к уравнению для вероятности обнаружить молекулу в оп-состоянии:

$$\dot{\rho}_{on} = -\frac{\rho_{on}}{\tau_{on}}, \quad (2.41)$$

где

$$\frac{1}{\tau_{on}} = k \frac{AT_1}{1 + (2k + G + \Gamma)T_1} = kY_{ISC}. \quad (2.42)$$

Здесь Y_{ISC} есть квантовый выход интеркомбинационной конверсии. Решением уравнения (2.41) является функция [3]

$$\rho_{on}(t) = c_{on} \exp(-t / \tau_{on}), \quad (2.43)$$

где c_{on} – коэффициент. Эту функцию можно рассматривать в качестве плотности вероятности найти он-интервал длительности t , если коэффициент подобран так, чтобы выполнялось условие для вероятности

$$\int_0^{\infty} P(t) dt = 1 \quad (2.44)$$

Подстановка формулы (2.43) в формулу (2.44) даёт $c_{on} = 1/\tau_{on}$. Следовательно, функция распределения длительности он-интервалов имеет следующий вид [3]:

$$P_{on} = \frac{1}{\tau_{on}} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{on}}\right), \quad (2.45)$$

где τ_{on} есть средняя длительность он-интервала.

Уравнение для off-состояний. Когда трёхуровневая молекула попадает в триплетное состояние, то флуоресценция прекращается. Вероятность пребывания в off-состоянии равна

$$\rho_{off} = \rho_2. \quad (2.46)$$

Для того чтобы найти уравнение для вероятности обнаружить молекулу в off-состоянии, необходимо отбросить член $A\rho_1$, описывающий приход молекулы в off-состояние из он-состояния, в третьем уравнении системы (2.29). Динамика off-состояния описывается уравнением [3]

$$\dot{\rho}_{off} = -g\rho_{off} \quad (2.47)$$

Повторяя рассуждения, приведшие к формуле (2.45), приходим к следующему выражению для плотности вероятности обнаружить молекулу в off-состоянии:

$$P_{off} = g \exp(-gt), \quad (2.48)$$

где

$$\tau_{off} = 1 / g \quad (2.49)$$

есть средняя длительность off-интервала.

В главе 2 были описаны различные методы статистической обработки флуктуаций интенсивности флуоресценции. Необходимо заметить, что флуктуировать могут также и спектральные, т.е. частотные характеристики излучателя («спектральная диффузия»). Из них также можно извлечь важную информацию о взаимодействии излучателя с окружением и т.д. Однако они не рассматриваются в данной диссертационной работе. Здесь рассматриваются только флуктуации *интенсивности* флуоресценции.

В главе 3 будет показано, как методы, описанные в главе 2, могут быть применены к случаю произвольного числа невзаимодействующих молекул. Также глава 3 представляет собой попытку дать ответ на вопрос: как определить, зарегистрирована ли в эксперименте флуоресценция одной одиночной молекулы, или лазер накачки возбуждает более одной молекулы?

Глава 3. Флукутирующая флуоресценция ансамбля одиночных невзаимодействующих молекул

3.1. Функция распределения числа фотонов флуоресценции нескольких невзаимодействующих молекул

Найдём выражения для функции распределения фотонов флуоресценции нескольких молекул, не взаимодействующих друг с другом. Пусть известны функции $w_{N_1}^{(1)}(T)$ и $w_{N_2}^{(2)}(T)$, описывающие распределение на временном интервале T фотонов флуоресценции молекул 1 и 2 соответственно. Поскольку процессы испускания фотонов молекулой 1 и 2 независимы, то функция $w(N_1, N_2, T) = w_{N_1}^{(1)}(T)w_{N_2}^{(2)}(T)$ является вероятностью наблюдать на интервале T N_1 фотонов, испущенных первой молекулой, и N_2 фотонов, испущенных второй молекулой. Если фотоны флуоресценции двух молекул различаются длиной волны, то, используя соответствующие светофильтры, располагая флуоресценцией двух молекул, можно измерить как вероятность $w_{N_1}^{(1)}(T)$, так и вероятность $w_{N_2}^{(2)}(T)$. Однако на практике измеряется интегральная интенсивность всего спектра флуоресценции двух молекул. В этом случае подсчитываются все фотоны, испущенные обеими молекулами. В таком случае функция распределения фотонов флуоресценции двух молекул на временном интервале T будет описываться уже следующей формулой:

$$w_N^2(T) = \sum_{n=0}^N w_{N-n}^{(1)}(T)w_n^{(2)}(T) \quad (3.1)$$

Формула для функции распределения фотонов на интервале T , испущенных M молекулами, имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} w_N^M(T) &= \sum_{n_1=0}^N w_{N-n_1}^{(1)}(T)w_{n_1}^{M-1}(T) = \\ &= \sum_{n_1=0}^N w_{N-n_1}^{(1)}(T) \sum_{n_2=0}^{n_1} w_{n_1-n_2}^{(2)}(T) \sum_{n_3=0}^{n_2} w_{n_2-n_3}^{(3)}(T) \dots \sum_{n_{M-1}=0}^{n_{M-2}} w_{n_{M-2}-n_{M-1}}^{(M-1)}(T)w_{n_{M-1}}^{(M)}(T) \end{aligned} \quad (3.2)$$

Данная формула способна описать флуоресценцию произвольного числа молекул, в том числе флуоресценцию ансамбля молекул.

Посмотрим, как меняется вид распределений (3.2) при различных типах молекул – двухуровневых и трёхуровневых – и также при возрастании числа M молекул.

Рассмотрим сначала M двухуровневых молекул. На рис.14 представлены распределения числа фотонов, рассчитанные по формуле (3.2) для одной, двух, трёх и четырёх одинаковых двухуровневых молекул.

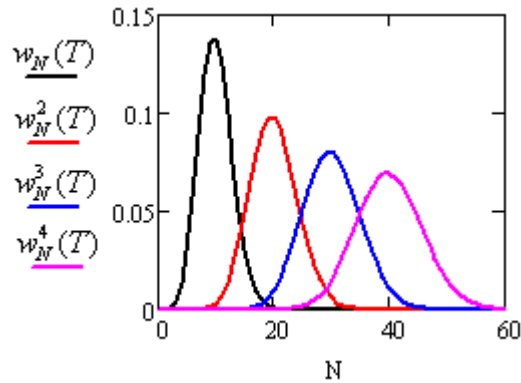


Рис.14. Распределение числа N фотонов для одной, двух, трёх и четырёх одинаковых двухуровневых молекул при $1/T_1 = 10/k$ на временном интервале $T = 10/k$.

Если каждая молекула является двухуровневой, распределение фотонов каждой из них близко к пуассоновскому, и общее распределение фотонов всех молекул также близко к пуассоновскому, как видно на рис.9. Субпуассоновская статистика флуоресценции одиночной двухуровневой молекулы порождает субпуассоновскую статистику ансамбля молекул. Среднее число фотонов флуоресценции M есть линейная функция M :

$$\langle N \rangle_M = M \langle N \rangle \quad (3.3)$$

где $\langle N \rangle$ среднее число фотонов в флуоресценции одиночной молекулы.

Ширина распределения нарастает пропорционально \sqrt{M} , т.к.

$$\sqrt{\langle N^2 \rangle_M - \langle N \rangle_M^2} = \sqrt{M(\langle N^2 \rangle - \langle N \rangle^2)} \quad (3.4)$$

Теперь рассмотрим случай нескольких невзаимодействующих трёхуровневых молекул. Распределения одной, двух и трёх таких молекул представлены на рис.15.

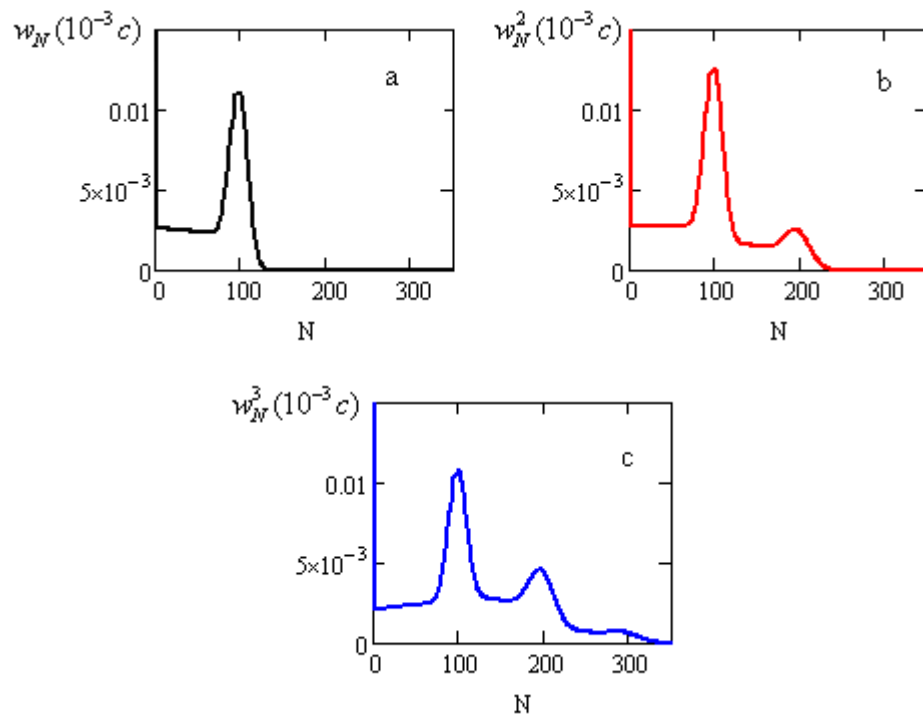


Рис.15. Распределение числа N фотонов на времени накопления сигнала $10^{-3}c$ одной (a), двух (b) и трёх (c) одинаковых трёхуровневых молекул с параметрами (2.33).

Распределение фотонов во флуоресценции одиночной молекулы на рис.15 (a) состоит из субпуассоновского пика с максимумом при $N=100$ и пологого плеча, простирающегося в сторону малых N . Распределение фотонов во флуоресценции двух одинаковых невзаимодействующих молекул, рассчитанное по формуле (3.2), представлено на Рис.15 (b). В этом распределении имеется уже два пика с максимумами при $N=100$ и 200 ; причём второй пик существенно ниже первого. Та же тенденция сохранится и во флуоресценции трёх невзаимодействующих молекул, распределение фотонов которой представлено на Рис.15 (c). Третий пик при $N=300$ выражен весьма слабо. В функции распределения фотонов флуоресценции четырёх молекул пик при $N=400$ практически не виден.

3.2. Параметр Манделя для флуоресценции нескольких невзаимодействующих молекул

С помощью формулы (3.2) можно проанализировать статистику фотонов флуоресценции молекулярного ансамбля с помощью параметра Манделя [28]. Последний зависит от первого и второго факториального момента распределения фотонов и имеет следующий вид:

$$Q = \frac{\langle N(N-1) \rangle - \langle N \rangle^2}{\langle N \rangle} \quad (3.5)$$

Известно, что при $Q = 0$ распределение фотонов пуассоновское. Если $Q < 0$, то распределение фотонов уже пуассоновского, т.е. субпуассоновское. Если же $Q > 0$, то распределение фотонов шире пуассоновского, т.е. суперпуассоновское. С помощью формулы (3.5) параметр Манделя фотонов флуоресценции двух молекул может быть через выражен через параметры Манделя фотонов флуоресценции молекул 1 и 2 [38]:

$$\begin{aligned} Q_{1+2} &= \frac{\langle N_1(N_1-1) \rangle - \langle N_1 \rangle^2 + \langle N_2(N_2-1) \rangle - \langle N_2 \rangle^2}{\langle N_1 \rangle + \langle N_2 \rangle} = \\ &= Q_1 \frac{\langle N_1 \rangle}{\langle N_1 \rangle + \langle N_2 \rangle} + Q_2 \frac{\langle N_2 \rangle}{\langle N_1 \rangle + \langle N_2 \rangle}. \end{aligned} \quad (3.6)$$

Параметр Манделя флуоресценции M молекул описывается следующей формулой:

$$Q_M = \frac{\sum_{j=1}^M Q_j \langle N_j \rangle}{\sum_{k=1}^M \langle N_k \rangle} \quad (3.7)$$

Из двух последних формул следует, что для M молекул с одинаковой флуоресценцией, каждая из которых имеет один и тот же параметр Манделя Q , параметр Манделя свечения M молекул равен параметру Манделя свечения одной молекулы, т.е.

$$Q_M = Q. \quad (3.8)$$

Следовательно, в рассматриваемом случае статистика фотонов флуоресценции M молекул совпадает со статистикой фотонов флуоресценции одной молекулы [38].

В общем случае это не так. Соотношение (3.8) нарушается, если молекулы, составляющие ансамбль, имеют разную статистику. Например, из формулы (3.6) следует, что, если свечение молекулы 1 субпуассоновское, т.е. $Q_1 < 0$, а свечение молекулы 2 суперпуассоновское, т.е. $Q_2 > 0$, возможен вариант, когда свечение двух молекул будет пуассоновским, т.е. $Q_{1+2} = 0$ [38].

3.3. Распределение длительностей on- и off-интервалов во флуоресценции нескольких невзаимодействующих молекул

Уравнение для расчета флуктуаций. Перескоки из on- состояния в off-состояние и обратно будут происходить в случайные моменты времени с вероятностями, описываемыми формулами (2.45) и (2.48). Чтобы найти такие случайные моменты, воспользуемся уравнением

$$rnd(1) = \int_0^t P(\tau) d\tau \quad (3.9)$$

где функция $rnd(1)$ определяет случайным образом число между 0 и 1 с постоянной плотностью вероятности. Величины t , найденные из этого уравнения и будут случайными моментами времени, распределенными с плотностью вероятности $P(t)$.

На рис.16а и 16b представлены рассчитанные таким образом флуктуации интенсивности флуоресценции двух разных молекул. Поскольку эти молекулы не взаимодействуют друг с другом, то флуктуации флуоресценции каждой молекулы независимы. Поэтому флуктуации суммарной флуоресценции двух молекул просто складываются, как показывает Рис.16с. Вследствие этого некоторые off-интервалы исчезают. Следовательно, во флуоресценции уже нескольких молекул все off-

интервалы исчезнут, т.е. флуоресценция превратится в непрерывную, как это обычно и наблюдают, имея дело с ансамблем молекул.

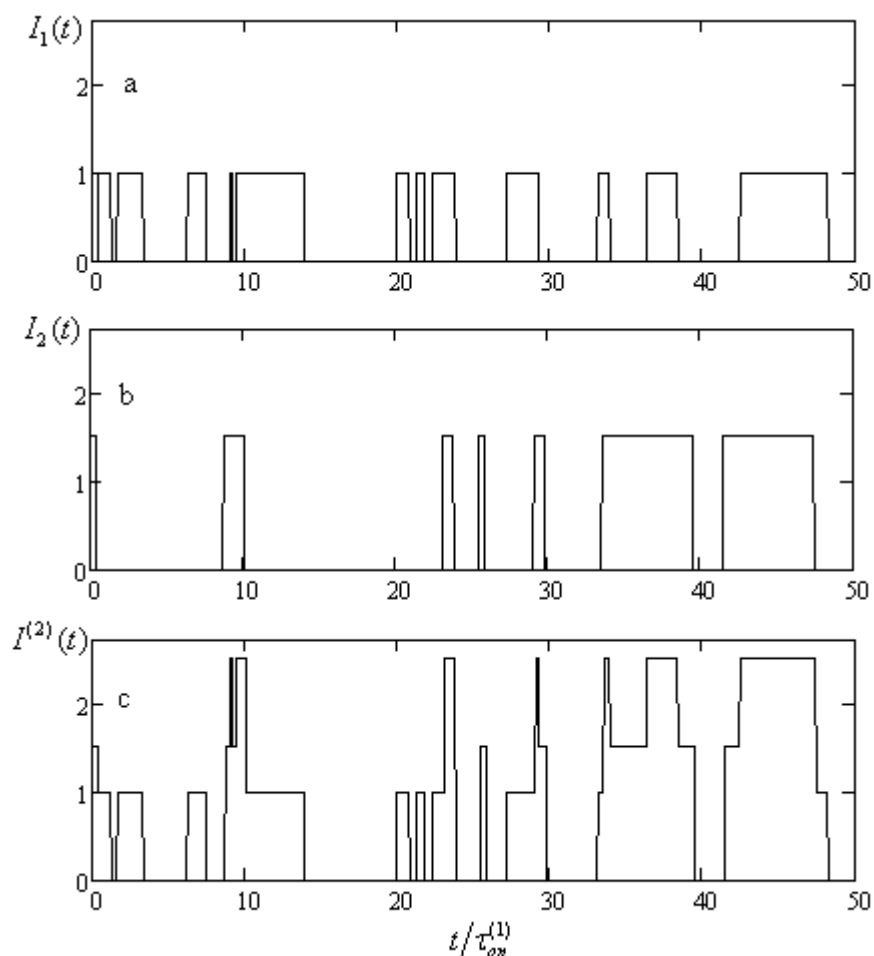


Рис.16. Квантовая траектория интенсивности флуоресценции двух невзаимодействующих молекул (а) и (b) и суммарной флуоресценции этих двух молекул (с).

Формулы (2.45) и (2.48) описывают распределение on- и off-интервалов по длительности во флуоресценции одиночной молекулы. Если измеряется флуоресценция каждой молекулы в отдельности, то имеются две квантовые траектории интенсивности, показанные на Рис.16а и 16б. Функции распределения on- и off-интервалов по длительности во флуоресценции молекулы 1 и 2 будут описываться следующими формулами:

$$P_{on}^1(t) = \frac{1}{\tau_{on}^1} \exp(-t / \tau_{on}^1), \quad P_{off}^1(t) = \frac{1}{\tau_{off}^1} \exp(-t / \tau_{off}^1),$$

$$P_{on}^2(t) = \frac{1}{\tau_{on}^2} \exp(-t / \tau_{on}^2), \quad P_{off}^2(t) = \frac{1}{\tau_{off}^2} \exp(-t / \tau_{off}^2).$$
(3.10)

Параметры в формулах (2.42) и (2.49), описывающих средние длины интервалов, были взяты для молекулы 1 согласно (2.33). Им соответствуют $\tau_{on}^1 = 3 \times 10^{-3} s$ и $\tau_{off}^1 = 5 \times 10^{-3} s$. Для молекулы 2 параметры были выбраны так, чтобы длины средних on- и off-интервалов были в 3 раза больше, т.е. $\tau_{on}^2 = 9 \times 10^{-3} s$ и $\tau_{off}^2 = 15 \times 10^{-3} s$.

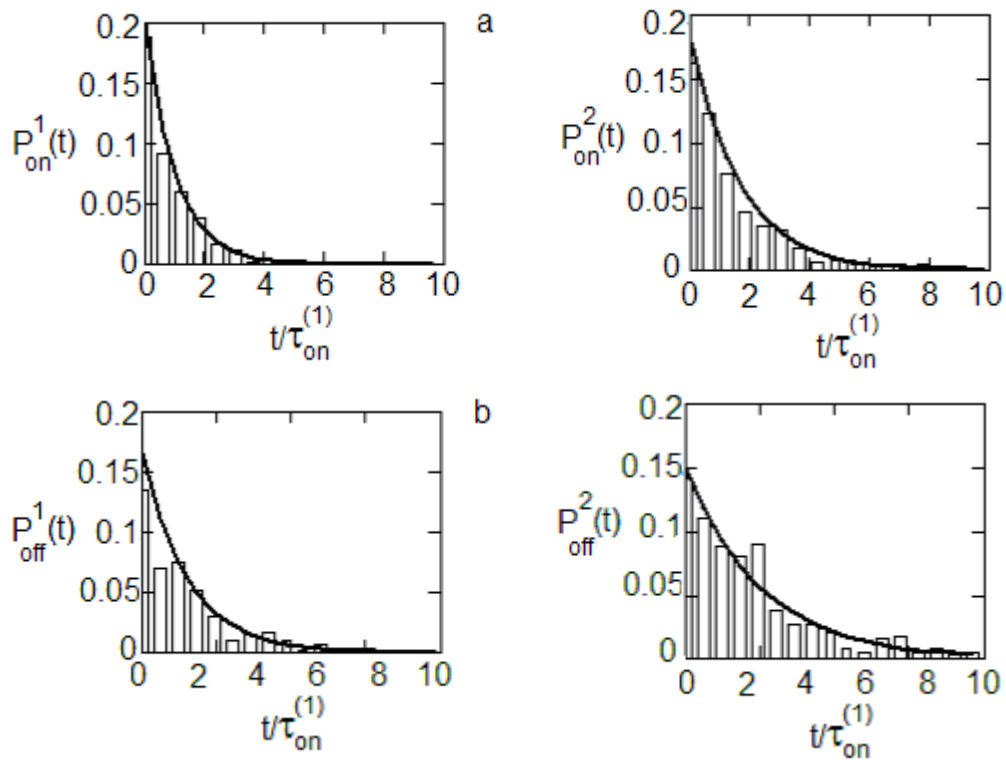


Рис.17. Распределение длин on- и off-интервалов во флуоресценции молекулы 1 и 2.

Эти функции показаны на Рис.17, на котором приведены также гистограммы соответствующих распределений, «измеренные» в мерцающей флуоресценции, изображённой на Рис.16а и Рис.16б.

Во флуоресценции двух молекул, которая показана на Рис.16с, также имеется четыре типа временных интервала, которые характеризуются

четырьмя интенсивностями: $0, I_1, I_2, I_1 + I_2$. Интервалы с нулевой интенсивностью соответствуют совпадению off-интервалов во флуоресценции молекул 1 и 2. Интервал с интенсивностью I_1 соответствует совпадению on-интервала в флуоресценции молекулы 1 с off-интервалом в флуоресценции молекулы 2, а с интенсивностью I_2 - совпадению on-интервала в флуоресценции молекулы 2 с off-интервалом в флуоресценции молекулы 1. И, наконец, интервал с интенсивностью $I_1 + I_2$ соответствует совпадению on-интервала в флуоресценции молекулы 1 с on-интервалом в флуоресценции молекулы 2.

Четырём значениям интенсивности $0, I_1, I_2, I_1 + I_2$ будут отвечать четыре функции распределения: $P_{off\ off}(t)$, $P_{on\ off}(t)$, $P_{off\ on}(t)$ и $P_{on\ on}(t)$. Поскольку on- и off-интервалы в молекуле 1 и молекуле 2 возникают независимо друг от друга, то вероятности, относящиеся к двум молекулам, будут произведением вероятностей, относящихся к каждой молекуле:

$$\begin{aligned} P_{off\ off}(t) &= c_{off\ off} \exp[-t(1/\tau_{off}^1 + \tau_{off}^2)], & P_{on\ off}(t) &= c_{on\ off} \exp[-t(1/\tau_{on}^1 + \tau_{off}^2)], \\ P_{off\ on}(t) &= c_{off\ on} \exp[-t(1/\tau_{off}^1 + \tau_{on}^2)], & P_{on\ on}(t) &= c_{on\ on} \exp[-t(1/\tau_{on}^1 + \tau_{on}^2)]. \end{aligned} \quad (3.11)$$

Для того, чтобы эти функции были плотностями вероятности, они должны удовлетворять условию (2.44). Подставляя формулы (3.11) в формулу (2.44) и вычисляя интеграл, находим явные выражения для коэффициентов c в формулах (3.11). С этими выражениями формулы (3.11) принимают следующий вид:

$$P_{off\ off}(t) = \left(1/\tau_{off}^1 + 1/\tau_{off}^2\right) \exp[-t(1/\tau_{off}^1 + 1/\tau_{off}^2)], \quad (3.12)$$

$$P_{on\ off}(t) = \left(1/\tau_{on}^1 + 1/\tau_{off}^2\right) \exp[-t(1/\tau_{on}^1 + 1/\tau_{off}^2)], \quad (3.13)$$

$$P_{off\ on}(t) = \left(1/\tau_{off}^1 + 1/\tau_{on}^2\right) \exp[-t(1/\tau_{off}^1 + 1/\tau_{on}^2)], \quad (3.14)$$

$$P_{on\ on}(t) = \left(1/\tau_{on}^1 + 1/\tau_{on}^2\right) \exp[-t(1/\tau_{on}^1 + 1/\tau_{on}^2)]. \quad (3.15)$$

Распределения (3.12), (3.13), (3.14) и (3.15) относятся к интервалам с интенсивностями $0, I_1, I_2, I_1 + I_2$ соответственно.

Эксперимент может быть проведён так, что в нём будут регистрироваться интервалы только двух типов: вообще без флуоресценции (off-off) и с флуоресценцией любой интенсивности (on-off, off-on и on-on). В этом случае распределение on-интервалов такого типа описывается следующей функцией:

$$P_{on}^{(2)}(t) = \frac{\exp[-(b+B)t] + \exp[-(b+A)t] + \exp[-(a+B)t]}{(b+B)^{-1} + (b+A)^{-1} + (a+B)^{-1}}. \quad (3.16)$$

Здесь $1/\tau_{on}^1 = b$, $1/\tau_{on}^2 = B$, $1/\tau_{off}^1 = a$, $1/\tau_{off}^2 = A$. Эти распределения приведены на Рис.18.

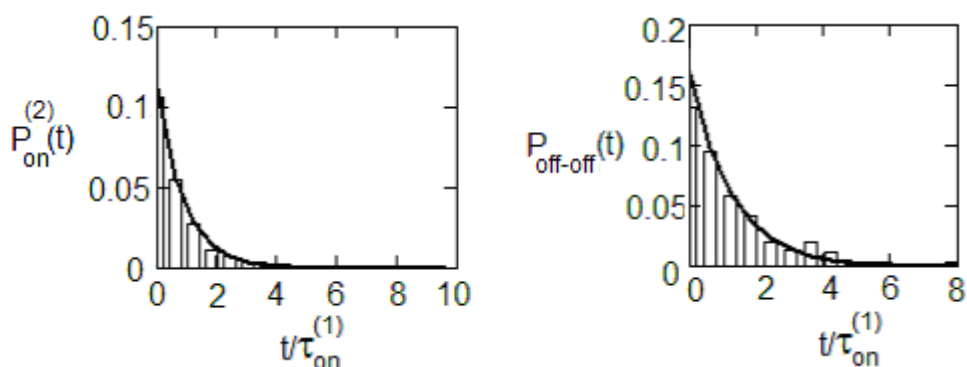


Рис.18. Распределение длин on- и off-интервалов во флуоресценции двух молекул.

3.4. Полный двухфотонный коррелятор и АФ флуоресценции нескольких невзаимодействующих молекул

Рассмотрим флуоресценцию двух невзаимодействующих молекул. Последовательность фотонов, испущенных обеими молекулами, схематично показана на рис.19. Фотоны, испущенные молекулами 1 и 2, показаны короткими и длинными вертикальными отрезками.

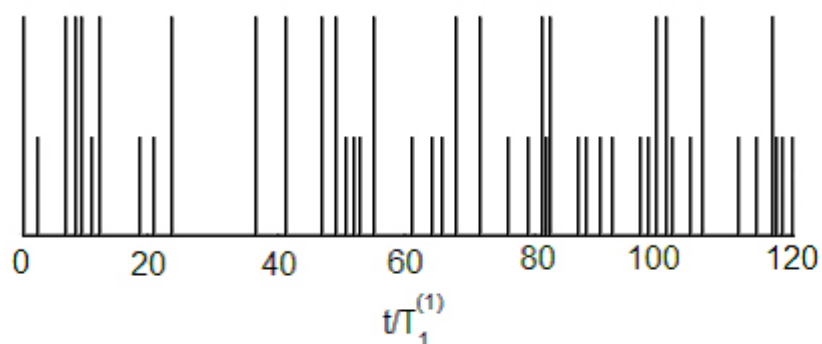


Рис.19. Временные моменты испускания фотонов флуоресценции молекулой 1 (короткие линии) и молекулой 2 (длинные линии)

Если спектральная область флуоресценции молекулы 1 и 2 различается, то, применяя светофильтры, можно детектировать фотоны, испущенные молекулами 1 и 2 по отдельности. В данном случае можно измерить четыре типа вероятностей:

$$dW_{nm}(t) = p_{nm}(t)dt \quad (3.17)$$

где первый индекс $n=1, 2$ нумерует молекулу, испустившую фотон в нулевой момент времени, а второй индекс $m=1, 2$ нумерует молекулу, испустившую фотон во временном интервале $(t, t+dt)$. Вероятности $p_{11}(t) = p_1(t)$ и $p_{22}(t) = p_2(t)$, при измерении которых оба фотона были испущены соответственно молекулой 1 и молекулой 2, есть полные корреляторы молекул 1 и 2. Вероятности $p_{12}(t)$ и $p_{21}(t)$, при измерении которых регистрируются начальный и конечный фотоны, испущенные разными молекулами, были названы кросс-корреляторами в работе [36].

Поскольку молекулы флуоресцируют независимо друг от друга, справедливы следующие соотношения:

$$\begin{aligned} p_{11}(\infty) &= p_{21}(\infty) = p_1(\infty), \\ p_{22}(\infty) &= p_{12}(\infty) = p_2(\infty) \end{aligned} \quad (3.18)$$

(как было сказано выше, левый индекс соответствует начальному фотону, правый – конечному). Формулы (3.18) говорят о том, что между любыми двумя фотонами нет корреляции при большой задержке. Так как фотоны,

испущенные каждой молекулой в отдельности, должны демонстрировать антигруппировку (см. параграф 2.5), то

$$p_{11}(0) = p_{22}(0) = 0. \quad (3.19)$$

Но при этом

$$\begin{aligned} p_{21}(0) &= p_1(\infty), \\ p_{12}(0) &= p_2(\infty). \end{aligned} \quad (3.20)$$

Из сопоставления формул (3.18) и (3.20) вытекает естественный результат [36]:

$$\begin{aligned} p_{21}(0) &= p_{21}(\infty) = p_{21}(\tau) = p_1(\infty), \\ p_{12}(0) &= p_{12}(\infty) = p_{12}(\tau) = p_2(\infty), \end{aligned} \quad (3.21)$$

т.е. корреляция между любой парой фотонов 1 и 2 отсутствует при любых временах «задержки» между фотонами, а соответствующий кросс-коррелятор определяется скоростью счёта фотонов, закрывающих интервал τ .

Выражения

$$\begin{aligned} P_1 &= p_1(\infty) / [p_1(\infty) + p_2(\infty)], \\ P_2 &= p_2(\infty) / [p_1(\infty) + p_2(\infty)] \end{aligned} \quad (3.22)$$

суть вероятности встретить фотон 1 и фотон 2 в общей последовательности фотонов, представленной на Рис.19. Поэтому

$$\begin{aligned} p_{(2)}(\tau) &= P_1[p_{11}(\tau) + p_{12}(\tau)] + P_2[p_{22}(\tau) + p_{21}(\tau)] = \\ &= \frac{P_1}{P_1 + P_2} [p_1(\tau) + p_2] + \frac{P_2}{P_1 + P_2} [p_2(\tau) + p_1] \end{aligned} \quad (3.23)$$

есть скорость счёта пар любых фотонов, разделённых интервалом времени τ [36]. Здесь использованы сокращённые обозначения: $p_1(\infty) = p_1$ и $p_2(\infty) = p_2$.

Согласно выражению (2.28), АФ флуоресценции двух молекул, равняющаяся единице на бесконечности, определяется следующей формулой [36]:

$$\begin{aligned} g_2^{(2)}(\tau) &= p_{(2)}(\tau) / p_{(2)}(\infty) = [p_1(\tau)p_1 + p_2(\tau)p_2 + 2p_1p_2](p_1 + p_2)^{-2} = \\ &= [p_1^2 g_1^{(2)}(\tau) + p_2^2 g_2^{(2)}(\tau) + 2p_1p_2](p_1 + p_2)^{-2} \end{aligned} \quad (3.24)$$

Эта формула выражает АФ флуоресценции двух молекул через АФ флуоресценции каждой из молекул и их полные двухфотонные корреляторы.

Формулы (3.23) и (3.24) обобщаются на случай флуоресценции M не взаимодействующих молекул следующим образом [36]:

$$p_{(M)}(\tau) = \frac{1}{\sum_{j=1}^M p_j} \sum_{j=1}^M \left[p_j p_j(\tau) + \sum_{k=1}^M (1 - \delta_{jk}) p_j p_k \right], \quad (3.25)$$

$$g_M^{(2)}(\tau) = \sum_{j=1}^M \left[p_j^2 g_j^{(2)}(\tau) + \sum_{k=1}^M (1 - \delta_{jk}) p_j p_k \right] \left(\sum_{j=1}^M p_j \right)^{-2}. \quad (3.26)$$

Эти формулы выражают полный двухфотонный коррелятор и АФ флуоресценции M различных не взаимодействующих молекул через полный двухфотонный коррелятор $p_j(\tau)$ и АФ флуоресценции $g_j^{(2)}(\tau)$ каждой из M молекул.

АФ флуоресценции нескольких не взаимодействующих молекул не выражается напрямую через АФ каждой из них, а только с применением полного двухфотонного коррелятора. Но так как АФ и полный двухфотонный коррелятор связаны формулой (2.28), т.е. отличаются в постоянное число раз $p(\infty) = \langle I(t) \rangle$, то полный двухфотонный коррелятор легко определяется из эксперимента.

Так как АФ флуоресценции часто измеряется в экспериментах, имеет смысл с помощью неё продемонстрировать, как квантовый свет одиночной молекулы переходит в классический свет ансамбля молекул.

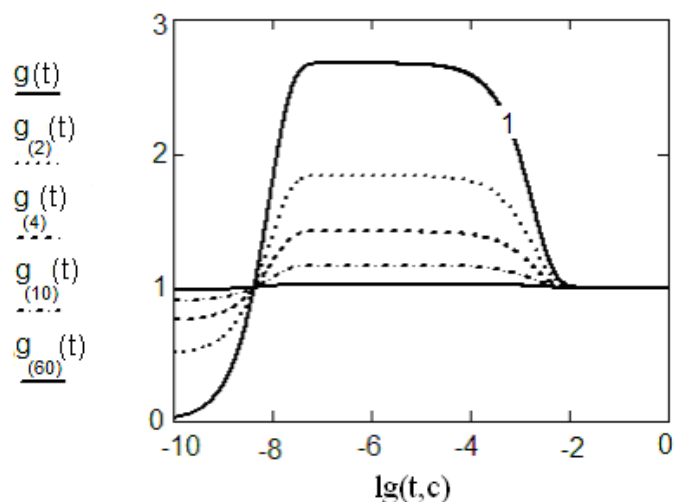


Рис. 20. АФ флуоресценции одной, двух, четырёх десяти и шестидесяти одинаковых молекул с параметрами (2.33), рассчитанные по формуле (3.26).

На рис. 20 изображены АФ флуоресценции одной, двух, четырёх десяти и шестидесяти одинаковых молекул, рассчитанные по формуле (3.26). Хорошо видно, что по мере увеличения числа молекул пропадают эффекты как антигруппировки, так и группировки, т.е. флуоресценция нескольких молекул приобретает черты классического света [36].

Если временное разрешение установки мало, и оно не позволяет наблюдать антигруппировку фотонов во флуоресценции одиночной молекулы, то $p_1(0) \neq 0$ и $p_2(0) \neq 0$. Эти величины будут зависеть от временного разрешения установки. Тогда можно ввести в рассмотрение новые корреляционные функции [38]

$$\begin{aligned} C_1(\tau) &= p_1(\tau) / p_1(0), \\ C_2(\tau) &= p_2(\tau) / p_2(0) \end{aligned} \quad (3.27)$$

для флуоресценции каждой молекулы и соответствующую корреляционную функцию для флуоресценции двух молекул:

$$C_{(2)}(\tau) = p_{(2)}(\tau) / p_{(2)}(0) = \frac{p_1 p_1(\tau) + p_2 p_2(\tau) + 2p_1 p_2}{p_1 p_1(0) + p_2 p_2(0) + 2p_1 p_2} \quad (3.28)$$

При выводе этой формулы было учтено, что $p^{(2)}(0) = 2p_1 p_2 / (p_1 + p_2)$. Корреляционная функция флуоресценции M молекул будет определяться следующей формулой:

$$C_M(\tau) = \frac{\sum_{j=1}^M \left[p_j p_j(0) C_j(\tau) + \sum_{k=1}^M (1 - \delta_{jk}) p_j p_k \right]}{\sum_{j=1}^M \left[p_j p_j(0) + \sum_{k=1}^M (1 - \delta_{jk}) p_j p_k \right]} \quad (3.29)$$

Формулы (3.25) и (3.26) позволяют проследить, каким образом усреднение флуктуаций, неизбежно имеющее место во флуоресценции нескольких молекул, проявляет себя в измеряемых в опыте автокорреляционной функции и двухфотонном корреляторе. Глубину перепада этих функций, называемую «контрастом», можно рассчитать, если подставить формулы (3.25) и (3.26) в выражения $g_M^{(2)}(\tau) - 1$ и $C_M(\tau) - C_M(\infty)$.

Для одинаковых молекул формулы для контраста упрощаются и могут быть выражены через контраст, измеряемый во флуоресценции одиночной молекулы:

$$g_M^{(2)}(\tau) - 1 = [g^{(2)}(\tau) - 1] / M ,$$

$$C_M(\tau) - C_M(\infty) = \frac{p(0)}{p(0) + (M - 1)p} [C(\tau) - C(\infty)] . \quad (3.30)$$

Отсюда следует, что контраст этих функций во флуоресценции M молекул стремится к нулю при увеличении числа молекул M . Кроме того, антигруппировка фотонов тоже исчезает с ростом числа молекул M .

На рис.21 представлены автокорреляторы $C(t)$ двух молекул, вычисленные с помощью формулы (3.28) (сплошной линией) и с помощью задания и обработки КТИ (гистограммой) с рис.16.

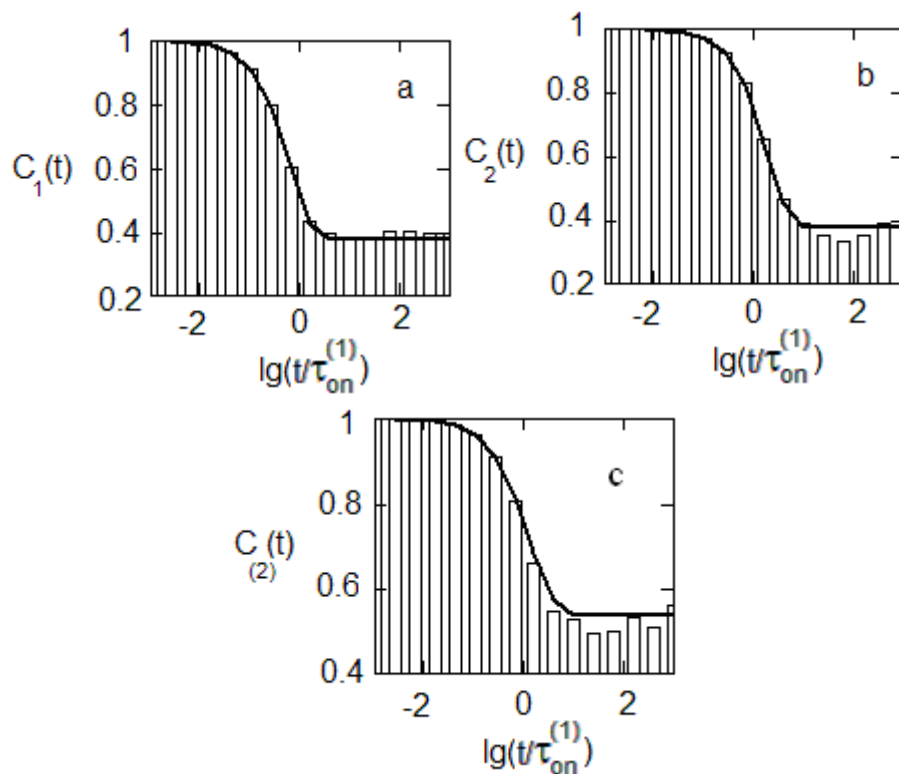


Рис.21. Корреляционная функция флуоресценции молекулы с параметрами (2.33) (а), молекулы с вдвое большими средними длительностями on- и off-интервалов $\tau_{on}^2 = 9 \times 10^{-3} c$ и $\tau_{off}^2 = 15 \times 10^{-3} c$ (б) и этих двух молекул.

Неплохое совпадение кривых с гистограммами подтверждает правильность выведенных формул (3.28) и (3.29). Из Рис.21с следует, что

контраст, т.е. глубина перепада величины $C_{(2)}(t)$ во флуоресценции двух молекул, меньше, чем во флуоресценции одной молекулы. С увеличением числа молекул контраст вообще станет нулевым, так как флуоресценция станет непрерывной.

3.5. Сравнение теории с экспериментом

В работе [10] регистрировалась флуоресценция одного и двух ионов Hg^+ и по экспериментальным данным рассчитывалась АФ флуоресценции. На рис. 22 представлены данные, полученные в этой работе.

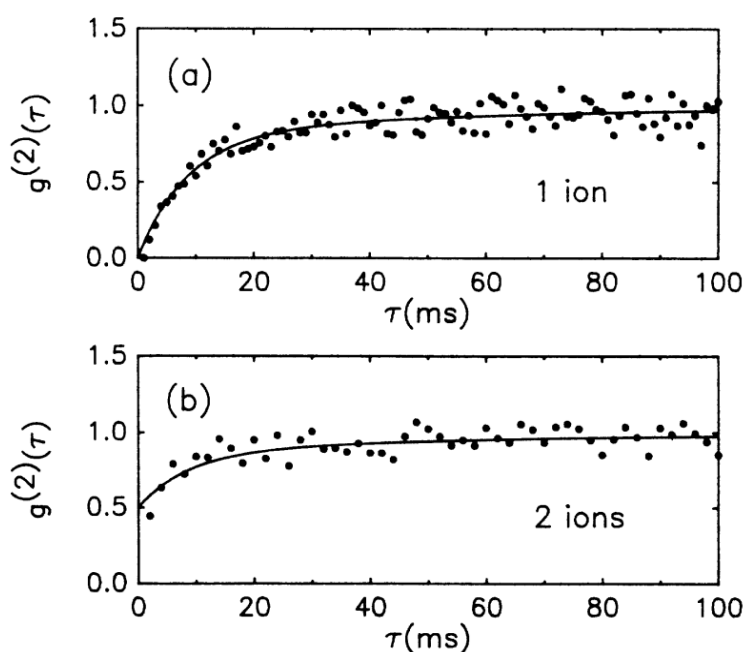


Рис.22. АФ флуоресценции одного (а) и двух (б) ионов Hg^+ , измеренные в работе [10]. Точки – экспериментальные данные. Сплошные линии – теоретический расчёт в работе [10].

Эффект антигруппировки фотонов во флуоресценции двух молекул пропадает. В соответствии с этим фактом, график АФ не равен нулю при нулевых временных промежутках τ . Это означает, что два фотона могут быть испущены с нулевой временной задержкой между ними, т.е. одновременно. Этот факт обусловлен отсутствием взаимодействия между излучающими частицами.

Теоретический расчёт, данный в работе [10], ведёт к результатам, совпадающим с формулой (3.24) для АФ флуоресценции двух невзаимодействующих частиц, которая является частным случаем теории, развитой в данной диссертационной работе для случая произвольного числа невзаимодействующих молекул.

Формулы теории, представленной в главе 3 данной диссертационной работы, применялись в экспериментальной работе [39] для обработки фотонов, зарегистрированных фотоприёмником. Фотоприёмник регистрирует как фотоны флуоресценции интересующей исследователей одиночной излучающей частицы («сигнал»), так и фотоны «шума». При этом фотоны «сигнала» неотличимы от фотонов «шума». В работе [39] было показано, что вычитать средний уровень шума из общего распределения числа фотонов «сигнал+шум» некорректно, если нас интересует распределение фотонов сигнала: эта процедура искажает данное распределение. Вместо этого для сравнения экспериментальных результатов с предсказаниями теоретической модели необходимо моделировать систему «сигнал+шум» с помощью формулы (3.1), где «сигнал» и «шум» выступают как два независимых источника излучения.

3.6. Основные выводы главы 3

В главе 3 представлена теория, описывающая флуктуации интенсивности флуоресценции произвольного числа невзаимодействующих частиц. Выведена формула для распределения числа фотонов во флуоресценции нескольких молекул. Проведён численный расчёт по этой формуле и показано, как отличается вид таких распределений для двухуровневых и трёхуровневых молекул. В случае двухуровневых молекул с немерцающей флуоресценцией форма распределения практически не меняется (близка к пуассоновской), а в случае трёхуровневых с мерцающей флуоресценцией форма распределения сложная со многими пиками. Выведена формула для параметра Манделя для случая нескольких молекул.

Продемонстрировано, что возможен случай, когда субпуассоновское распределение числа фотонов одних молекул и суперпуассоновское распределение других даст в итоге пуассоновское распределение для ансамбля. Показано, каким образом можно рассчитать распределение on- и off-интервалов во флуоресценции нескольких молекул. Выведенные формулы проверены с помощью компьютерного моделирования эксперимента по методу Монте-Карло. Наконец, с помощью выведенных для АФ флуоресценции нескольких молекул формул и численных расчётов по ним показано, каким образом квантовый свет одиночной молекулы переходит в классический свет ансамбля молекул по мере увеличения числа молекул в ансамбле.

Глава 4. Безызлучательная передача энергии электронного возбуждения между молекулами

В главах 1-3 данной диссертационной работы описывалась флукутуирующая флуоресценция невзаимодействующих молекул. В главах 4-5 будет рассматриваться один из важнейших случаев взаимодействия между молекулами, когда одна молекула передаёт энергию своего электронного возбуждения другой молекуле, т.е. донор-акцепторные пары.

4.1. Безызлучательная передача энергии при фотосинтезе

Сущность такого процесса передачи энергии состоит в следующем. Частица, которую называют донором, переходит в возбуждённое состояние, а затем без излучения фотона передаёт энергию электронного возбуждения некоторой достаточно близко расположенной (на расстояниях порядка десятков Å) частице – акцептору. После этого донор оказывается в основном состоянии, акцептор – в возбуждённом.

Данное явление имеет чрезвычайную значимость. Например, благодаря ему фотосинтез осуществляется с высокой эффективностью.

Эмерсоном и Арнольдом [40] в 1930-х годах было экспериментально установлено, что листья растений используют энергию света значительно эффективнее, чем ожидалось. Центры реакции фотосинтеза расположены редко. Но даже если фотоны попадали бы напрямую в центры реакции, эффективность фотосинтеза не была бы такой высокой. Этот факт можно было объяснить только передачей энергии между молекулами хлорофилла, поглощающими свет по всей поверхности листа. Энергия, случайным образом “перескакивая” между молекулами, попадает в относительно редко расположенные центры реакции.

В биологии принято выделять три этапа фотосинтеза: фотофизический этап (поглощение света и передача энергии к центру реакции), фотохимический этап (разделение зарядов в реакционном центре, перенос электронов по электротранспортной цепи и синтез АТФ) и темновую

стадию (синтез органических веществ с помощью энергии, накопленной в связях АТФ). С темой данного обзора – передачей энергии электронного возбуждения – связан первый, фотофизический этап. Рассмотрим его детальнее.

Фотосинтез осуществляется фотосинтетической единицей, которая содержит ансамбль молекул, поглощающих свет (светособирающие комплексы, light-harvesting systems, LH) и передающих друг другу энергию электронного возбуждения, и молекулу, выступающую в роли центра реакции. Светособирающие комплексы состоят из хлорофилла а и в (рис. 23), а также из небольшого числа других пигментов, например, каротиноидов (жёлтых и оранжевых пигментов, производных изопрена).

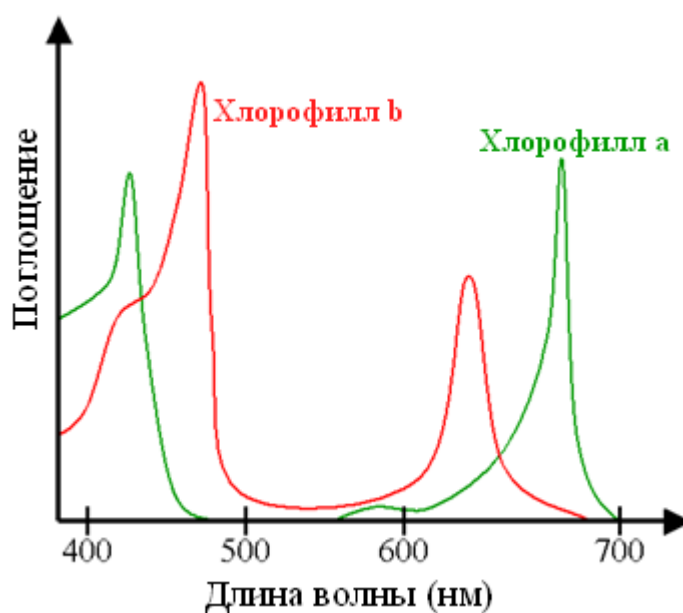


Рис.23. Спектры хлорофилла а и в.

Более 90% всего хлорофилла, содержащегося в хлоропластах растений, входит в состав светособирающих комплексов. Пигменты светособирающих комплексов имеют разные энергетические уровни и локализуются в таком порядке, чтобы передача энергии шла по направлению к центрам реакции. В центрах реакции находятся самые длинноволновые хлорофиллы. Передача энергии реализуется на расстояния порядка 1 нм со скоростями порядка 10^{10}

– 10^{12} c^{-1} . Данный механизм обеспечивает несравнимо более высокую эффективность процесса, чем была бы при непосредственном "использовании" фотонов только центрами реакции.

Схема на рис. 24 поясняет механизм передачи энергии.

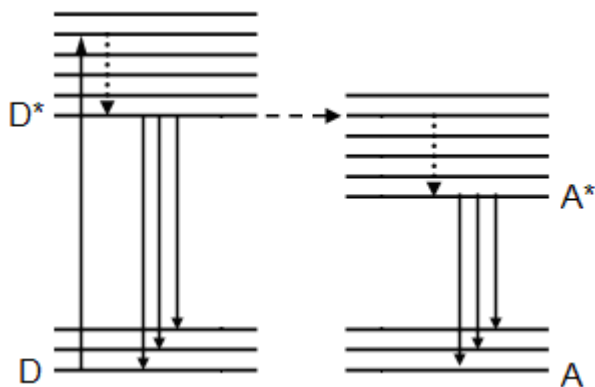


Рис.24. Безызлучательная передача энергии от донора (D) к акцептору (A).

Здесь D, A – донор и акцептор в основном энергетическом состоянии, D*, A* - в первом возбуждённом. Каждый из этих электронных уровней сопровождается несколькими колебательными. Сплошными стрелками показаны процессы поглощения донором фотона возбуждающего света (характерные скорость порядка 10^6 c^{-1}) и флуоресценция донора и акцептора (характерные скорости порядка 10^8 c^{-1}). Точками показана колебательная релаксация возбуждённых частиц с характерными скоростями порядка 10^{12} c^{-1} . Пунктирной стрелкой изображён процесс передачи энергии: переход системы из состояния D*A в состояние DA*. Передача энергии реализуется на тот колебательный уровень возбуждённого акцептора, энергия которого равна энергии возбуждённого донора. Поэтому говорят о резонансной передаче энергии.

Быстрая колебательная релаксация возбуждённого акцептора, изображённая точками, имеет большое значение для частного случая процесса передачи энергии, который рассматривается в данной диссертации. Этот случай в англоязычной литературе получил название FRET, Förster resonance energy transfer – Фёрстеровская резонансная передача энергии, по имени Теодора Фёрстера, давшего современное описание процесса. FRET

реализуется при слабом диполь-дипольном взаимодействии донора и акцептора – таком, что скорость передачи энергии много меньше скоростей колебательной релаксации. В этом случае передача энергии необратима, так как нарушается энергетический резонанс донора и акцептора.

Ключевой вопрос, который встаёт при теоретическом описании процесса передачи энергии – как рассчитать скорость передачи энергии? Теории, обсуждаемые ниже, в дальнейших параграфах главы 4, имели целью дать ответ на этот вопрос.

4.2. Классические теории передачи энергии между молекулами

Первые исследования безызлучательной передачи энергии между двумя частицами начались в 1920-е годы. Жан Перрен предложил классическую теорию безызлучательной передачи энергии на расстоянии в 1927 году [41]. Он создал эту теорию, чтобы решить проблему, известную с 1920 года [42, 43] – деполяризацию флуоресценции с ростом концентрации органических красителей в растворах после достижения некоторого критического значения концентрации. Поляризация флуоресценции измеряется как угловое отклонение плоскости поляризации возбуждающих фотонов от плоскости поляризации фотонов флуоресценции. Поляризация начинает уменьшаться, когда молекулы имеют такую концентрацию, что находятся на расстоянии в 50-80 Å. Преодолеть такое расстояние посредством диффузии за время жизни в возбуждённом состоянии они не могут. Следовательно, было ясно, что они должны передавать энергию на расстоянии, а не путём соударений.

Теория Перрена предполагала диполь-дипольное взаимодействие. Излучающая частица рассматривалась как осциллирующий диполь – диполь Герца. Утверждалось, что при наличии в ближнем поле другого подобного осциллятора возможна передача энергии подобно процессу в механической системе двух классических связанных гармонических осцилляторов. Оба осциллятора должны иметь одинаковые частоты, т.е. энергия передаётся при резонансе. Поэтому Перрен назвал процесс тем словосочетанием, которое

осталось до сих пор: «флуоресцентная резонансная передача энергии», «fluorescence resonance energy transfer, FRET». Альтернативная расшифровка аббревиатуры «Förster resonance energy transfer», «Фёрстеровская резонансная передача энергии», появилась позже.

Скорость F передачи энергии, по Жану Перрену, зависела от расстояния R между донором и акцептором как $F(R) \propto 1/R^3$ [44]. Расстояние, в пределах которого должна была осуществляться передача энергии, составляло по оценке Перрена порядка $\lambda/2\pi$, где λ - длина волны света, излучаемого осциллирующим диполем. То есть, по теории Жана Перрена передача энергии должна была осуществляться на расстояниях до порядка 1000 \AA , в то время как по экспериментальным данным она осуществлялась на расстояниях порядка нескольких десятков \AA , то есть примерно в 20 раз меньше рассчитанного.

Такое большое расхождение теории и эксперимента объяснялось, прежде всего, не классическим подходом, а тем фактом, что не учитывалась ширина спектров взаимодействующих частиц.

Галанин и Франк учли ширину спектров донора и акцептора в их классической теории в 1951 году [45, 46]. Их результаты, несмотря на неклассический подход, близки и к рассчитанным по теории Фёрстера, которой пользуются сейчас (см ниже), и к экспериментальным. Рассмотрим, каким образом в их теории рассчитывалась скорость передачи энергии.

Молекулы донора и акцептора моделируются осциллирующими диполями с частотами колебаний ω_D и ω_A и затуханиями γ_D и γ_A . Если x и y – смещения электронов в доноре и акцепторе, а χ - коэффициент связи осцилляторов, то можно написать следующие уравнения [46]:

$$\left. \begin{aligned} \ddot{x} + \gamma_D \dot{x} + \omega_D^2 x &= \chi y \\ \ddot{y} + \gamma_A \dot{y} + \omega_A^2 y &= \chi x \end{aligned} \right\}. \quad (4.1)$$

В решении уравнений (4.1) появляется дополнительное затухание донора. При условии, что связь осцилляторов слабая ($\chi/\omega_D^2 \ll 1$), новый коэффициент затухания γ'_D выражается следующим образом [33]:

$$\gamma'_D = \gamma_D + \frac{\chi^2 \gamma_A}{4\omega_D^2} \left[\left(\frac{\gamma_A}{2} \right)^2 + (\omega_D - \omega_A)^2 \right]^{-1}. \quad (4.2)$$

Добавка к затуханию γ_D в правой части выражения (4.2) определяет скорость передачи энергии от донора к акцептору.

4.3. Ранние квантовые теории безызлучательной передачи энергии

Каллманн и Лондон [48] построили первую квантовую теорию резонансной передачи энергии в 1928 году. В их работе впервые изложен квантовый диполь-дипольный механизм взаимодействия. Они исследовали передачу энергии между атомами в атомарных парах. Взаимодействующие атомы моделировались двухуровневыми системами с узкими энергетическими уровнями, т.е. уширение спектров не учитывалось, но точный резонанс не считался необходимым.

Вероятность передачи энергии $|c^2|$ в данном случае осциллирует во времени [44]:

$$|c^2| = \frac{\beta^2}{1 + \beta^2} \sin^2 \left[\frac{\pi}{h} (\Delta + \langle D^* A | W | D^* A \rangle - \langle DA^* | W | DA^* \rangle) \sqrt{1 + \beta^2} \cdot t \right], \quad (4.3)$$

где $\beta = 2\langle D^* A | W | DA^* \rangle / (\Delta + \langle D^* A | W | D^* A \rangle - \langle DA^* | W | DA^* \rangle)$, Δ – разность уровней энергии донора и акцептора, W – оператор возмущения, $W = d_A d_D / R^3$, d_A и d_D – операторы дипольных моментов перехода в доноре и акцепторе. Начальное состояние системы, возбуждённый донор и акцептор в основном состоянии – D^*A , конечное – DA^* , возбуждённый акцептор и донор в основном состоянии.

Усреднение по времени выражения (4.3) даёт вероятность E того, что передача энергии будет осуществлена [44]:

$$E = \frac{1/2}{1 + \left(\frac{2d_D d_A / R^3}{\Delta} \right)^{-2}} = \frac{1/2}{1 + \frac{R^6}{4(d_D d_A)^2 / \Delta^2}} = \frac{1/2}{1 + \frac{R^6}{a^6}}, \quad (4.4)$$

где a – некоторая постоянная, имеющая размерность расстояния. Выражение (4.4) совпадает за исключением множителя $1/2$ с эффективностью передачи энергии в теории Фёрстера (см. ниже), а параметр a является фактически фёрстеровским радиусом R_0 . Расхождение в $1/2$ раз возникает потому, что Калламан и Лондон не учитывали ширины спектров донора и акцептора, а потому получили осциллирующее решение и усреднили его по времени. В их подходе передача энергии не является необратимой.

Франсис Перрен, сын Жана Перрена, развил идеи Каллманна и Лондона и обобщил их теорию для взаимодействия в атомарных парах на случай растворов. Его работы были опубликованы в 1932 и 1933 годах [49, 50]. Он учёл, что соударения с молекулами растворителя уширяют спектр донора и акцептора. А так как для передачи энергии необходим резонанс, уширенный спектр уменьшает вероятность взаимодействия.

Решение данной задачи Ф. Перрен также дал в осциллирующем виде – вероятность передачи энергии меняется как синус от αt , где частота α , выражаемая через параметры системы, и определяет скорость передачи энергии [44]. Эта скорость зависит от расстояния между молекулами, по Ф. Перрену, как $F(R) \propto 1/R^3$. Или, для сравнения с теорией Жана Перрена, передача энергии должна была осуществляться на расстояния до $(\lambda/2\pi)(\bar{t}/\tau)^{\frac{1}{6}}$ [40], где \bar{t} – среднее время между соударениями с молекулами растворителя ($\sim 10^{-13}$ с), а τ – время жизни флуоресцирующей молекулы ($\sim 10^{-8}$ с). Таким образом, ориентировочное максимальное значение расстояния между донором и акцептором, при котором передача энергии ещё возможна, было оценено в 200-250 Å, что меньше, чем значение, рассчитанное Жаном Перреном – 1000 Å – но всё же не соответствует действительности для тех концентраций доноров и акцепторов, которые использовались в экспериментах.

Решение задачи о вероятности передачи энергии в осциллирующем во времени виде, которое было получено в этих двух ранних работах, характерно для обратимой передачи энергии, где механизм передачи носит экситонный характер. Он реализуется в действительности как один из частных случаев, но не должен быть обобщён на любую передачу энергии электронного возбуждения. Разница между обратимой, экситонной передачей энергии и необратимой, FRET, будет подробнее описана ниже, при обсуждении работы Давыдова в рамках границ применимости теории Фёрстера.

4.4. Теория Фёрстера

К моменту создания Фёрстером современной теории безызлучательной передачи энергии было известно, что этот процесс играет важнейшую роль в фотосинтезе. При этом удовлетворительной квантовомеханической теории передачи энергии не было. Это стало мотивацией создания Фёрстером качественного объяснения передачи энергии в 1946 году [51] и количественной квантовомеханической теории, общепринятой по настоящий момент, в 1948 [52]. Выражение для скорости передачи энергии, полученное в рамках этой теории, содержит только экспериментально измеряемые величины. Ценность такой теории настолько велика, что сам процесс был впоследствии назван именем Фёрстера – FRET, Förster Resonance Energy Transfer (иногда аббревиатуру расшифровывают Fluorescence Resonance Energy Transfer).

4.4.1. Скорость передачи энергии

Рассмотрим, каким образом в теории Фёрстера выводится выражение для скорости передачи энергии.

Фёрстер взял за основу золотое правило Ферми, выражение для вероятности W перехода системы из начального состояния ψ_1 в конечное ψ_2 :

$$W = \frac{2\pi}{\hbar} \rho \left| \langle \psi_1 | H | \psi_2 \rangle \right|^2, \quad (4.5)$$

где ρ - плотность конечных состояний, H – гамильтониан взаимодействия. В случае передачи энергии начальное состояние системы – возбуждённый донор и невозбуждённый акцептор, $\psi_1 = \psi_D^* \psi_A$, конечное – невозбуждённый донор и возбуждённый акцептор, $\psi_2 = \psi_D \psi_A^*$. Здесь ψ_D и ψ_A – волновые функции невозбуждённых донора и акцептора, ψ_D^* и ψ_A^* – возбуждённых частиц. В адиабатическом приближении каждая волновая функция донора и акцептора представляет собой произведение электронной волновой функции D , A или D^* , A^* на колебательную $\varphi_{D,A}(i)$ или $\varphi_{D,A}^*(i)$:

$$\psi_D = D \prod_i \varphi_D(i), \quad \psi_A = A \prod_i \varphi_A(i), \quad \psi_D^* = D^* \prod_i \varphi_D^*(i), \quad \psi_A^* = A^* \prod_i \varphi_A^*(i). \quad (4.6)$$

Разложение гамильтониана взаимодействия по мультиполям даёт следующее выражение [47]:

$$\begin{aligned} H(R) = & \frac{e^2}{\varepsilon R^3} \left\{ (\vec{r}_D \vec{r}_A) - \frac{3}{R^2} (\vec{r}_D \vec{R})(\vec{r}_A \vec{R}) \right\} + \\ & + \frac{3e^2}{2\varepsilon R^4} \left\{ \sum_{i=1}^3 \frac{R_i}{R} r_{Ai}^2 r_{Di} \left(-3 + 5 \frac{R_i^2}{R^2} \right) + 10 \frac{XYZ}{R} (x_A y_A z_D + x_A y_D z_A + x_D y_A z_A) \right\} + \\ & + \sum_{i \neq j}^3 \left\{ \left(\frac{R_j}{R} - 5 R_i^2 \frac{R_j}{R^3} \right) (-r_{Ai}^2 r_{Dj} - 2 r_{Ai} r_{Aj} r_{Di}) \right\} + \dots \end{aligned} \quad (4.7)$$

Здесь \mathbf{R} – вектор, соединяющий молекулы донора и акцептора ($R_x = X$, $R_y = Y$, $R_z = Z$), r_D и r_A – векторы, соединяющие центры тяжести молекул с их электронами, R_i , r_{Di} , r_{Ai} – их проекции на оси декартовых координат, ε – диэлектрическая проницаемость среды.

Первые фигурные скобки выражения (4.7) описывают диполь-дипольное взаимодействие, вторые – диполь-квадрольные. При разрешённых диполь-дипольных переходах можно ограничиться первым членом выражения (4.7), представляющим собой диполь-дипольное взаимодействие.

Подстановка гамильтониана (4.7) и волновых функций (4.6) в выражение для вероятности перехода (4.5) приводит к следующей формуле для скорости F передачи энергии [47]:

$$F(R) = \frac{9\hbar^4 c^4 K^2}{8\pi n^4 T_D R^6} \int f_D(E) \sigma_A(E) E^{-4} dE, \quad (4.8)$$

где n – показатель преломления среды, K^2 – ориентационный фактор

$$K = \cos(\vec{r}_D, \vec{r}_A) - 3 \cos(\vec{r}_D, \vec{R}) \cos(\vec{r}_A, \vec{R}), \quad (4.9)$$

T_D – время жизни донора в возбуждённом состоянии в отсутствие передачи энергии, R – расстояние между донором и акцептором, $f_D(\omega)$ – нормированный спектр излучения донора, $\sigma_A(\omega)$ – сечение поглощения акцептора.

Следует ещё раз подчеркнуть, что выражение (4.8) содержит только экспериментально наблюдаемые величины, что составляет его огромное преимущество.

В выражении (4.8) присутствует интеграл перекрытия спектров излучения донора и поглощения акцептора $\int f_D(\omega) \sigma_A(\omega) d\omega$, то есть учтено уширение спектров за счёт электрон-фононного взаимодействия и взаимодействия исследуемых частиц с окружением. Смысл данного интеграла поясняет рис. 25.

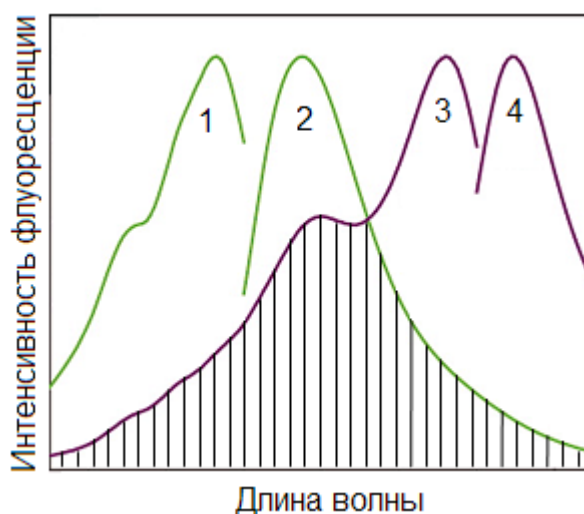


Рис. 25. Перекрытие спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора. 1 – поглощение донора, 2 – флуоресценция донора, 3 – поглощение акцептора, 4 – флуоресценция акцептора. Заштрихованная область – перекрытие спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора.

4.4.2. Эффективность передачи энергии. Фёрстеровский радиус

По определению, эффективность E передачи энергии – это отношение интенсивности флуоресценции акцептора к суммарной интенсивности обеих молекул:

$$E = \frac{I_A}{I_A + I_D}. \quad (4.10)$$

На рис. 26 приведена простейшая схема донор-акцепторной пары:

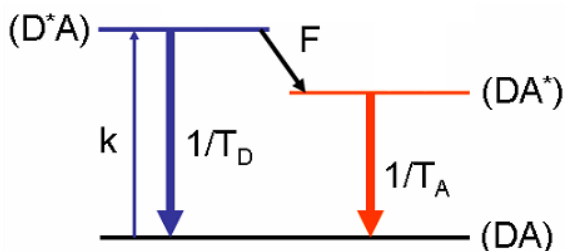


Рис. 26. Простейшая схема донор-акцепторной пары.

Здесь k , F , $1/T_{D,A}$ – скорости возбуждения донора, передачи энергии и флуоресценции донора и акцептора. Передача энергии реализуется с уровня D^*A – донор в возбуждённом состоянии, акцептор в основном состоянии. С этого уровня система может перейти в состояние DA , излучив фотон донорной флуоресценции с вероятностью $\frac{1/T_D}{1/T_D + F} = \frac{1}{1 + FT_D}$, или в состояние

DA^* с помощью передачи энергии с вероятностью $\frac{F}{1/T_D + F} = \frac{FT_D}{1 + FT_D}$. Поэтому

обычно эффективность передачи энергии считают равной

$$E = \frac{FT_D}{1 + FT_D}. \quad (4.11)$$

Этот подход также предполагает, что интенсивность акцепторной флуоресценции пропорциональна интенсивности донорной флуоресценции, причём коэффициент пропорциональности – отношение скоростей передачи энергии и флуоресценции донора:

$$I_A = FT_D I_D, \quad (4.12)$$

Выражением (4.11) обычно пользуются в экспериментах. Эффективность E передачи энергии – экспериментально наблюдаемая величина. Зная скорость флуоресценции донора T_D , по формуле (4.11) определяют скорость передачи энергии F . Так как она зависит от расстояния, согласно (4.8), как $F(R) \propto 1/R^6$, то можно использовать FRET как инструмент для измерения расстояний порядка десятков Å. Подробный обзор примеров такого использования дал Стиер [53]. Огромное преимущество такого метода состояло в том, что он позволял регистрировать изменения расстояний между донором и акцептором, на порядок меньших длины волны видимого света, то есть позволял преодолеть дифракционный предел. Это преимущество используется и на сегодняшний день при исследованиях, например, изменения конформаций сложных органических молекул, таких как ДНК и РНК, или проникновения белков внутрь клетки и т.д. К исследуемым молекулам прикрепляют донор и акцептор и регистрируют изменение интенсивности их флуоресценции. С развитием техник сверхразрешения (super-resolution) это преимущество потеряло свою уникальность, но, тем не менее, FRET и на сегодняшний день используют в сочетании с этими техниками [54].

Выражение (4.11) может быть записано в другом виде, с введением нового параметра, удобного для эксперимента – фёрстеровского радиуса R_0 . Данный параметр представляет собой расстояние, на котором интенсивность акцепторной флуоресценции равна интенсивности донорной флуоресценции. Эффективность передачи энергии при этом равна 1/2. Это означает, что, согласно выражению (4.12), скорость передачи энергии на это расстоянии равна скорости флуоресценции донора. Воспользовавшись выражением (4.8), получаем

$$\frac{1}{T_D} = \frac{9\hbar^4 c^4 K^2}{8\pi n^4 T_D R_0^6} \int f_D(E) \sigma_A(E) E^{-4} dE, \quad (4.13)$$

откуда можно найти фёрстеровский радиус R_0 . С учётом этого, выражение (4.11) может быть переписано в виде

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}, \quad (4.14)$$

которым также часто пользуются в экспериментальных работах. Параметр R_0 специфичен для каждой пары молекул и их ориентации друг относительно друга.

4.4.3. Ориентационный фактор

Ориентационный фактор K^2 (4.9) может принимать значения от 0 до 4. Если и донор, и акцептор свободно вращаются с характерным временем много меньше времени жизни донора в возбуждённом состоянии, K^2 усредняется и принимает значение $2/3$ [43]. Если это условие не выполняется, возникает вопрос, какое значение ориентационный фактор имеет.

Во FRET-экспериментах по определению расстояния между молекулами донора и акцептора пользуются формулой зависимости эффективности передачи энергии от фёрстеровского радиуса (4.14). Фёрстеровский радиус R_0 зависит от ориентационного фактора K^2 . Из наблюдаемой эффективности передачи энергии E можно определить так называемое наблюдаемое расстояние (apparent distance) r' , посчитанное с учётом $K^2 = 2/3$. Фактическое расстояние r связано с ним соотношением

$$r = ar' = \left(\frac{K^2}{2/3}\right)^{1/6} r'. \quad (4.15)$$

Так как K^2 может принимать значения от 0 до 4, a может принимать значения от 0 до 1.35. На практике диапазон значений a существенно меньше, так как обычно можно учесть вероятность углового распределения дипольных моментов. Согласно Стиеру [43], неопределённость, вносимая угловым фактором K^2 в определение расстояния между донором и акцептором, обладающими ограниченной ротационной мобильностью, обычно не больше 20%.

4.5. Теория Декстера

4.5.1. Взаимодействия высшей мультипольности

Общепринятая формула (4.8), выведенная Фёрстером для скорости передачи энергии, учитывает только диполь-дипольную компоненту взаимодействия. Декстер в 1953 году рассмотрел взаимодействия высшей мультипольности – диполь-квадрупольные, квадруполь-квадрупольные и т.д.

Диполь-квадрупольное взаимодействие будет играть роль, если дипольный переход в акцепторе запрещён. Чтобы найти скорость перехода в данном случае, необходимо подставить второй член гамильтониана $H(R)$ (4.7), отвечающий за данное взаимодействие, в формулу золотого правила Ферми (4.5). Такая подстановка приводит к выражению [54]

$$F_{dq}(R) = const \cdot \frac{\hbar^6 c^6}{\pi n^4 T_D R^8} \int f_D(E) \sigma_A(E) E^{-6} dE. \quad (4.16)$$

Скорость передачи энергии посредством диполь-квадрупольного взаимодействия зависит от расстояния как $F_{dq} \propto 1/R^8$, в отличие от скорости передачи посредством диполь-дипольного взаимодействия $F_{dd} \propto 1/R^6$.

Если дипольный переход запрещён не только в акцепторе, но и в доноре, то всё взаимодействие определяется его квадруполь-квадрупольной составляющей. Скорость передачи энергии в данном случае определяется следующим образом [54]:

$$F_{qq}(R) = const \cdot \frac{\hbar^8 c^8}{\pi n^4 T_D R^{10}} \int f_D(E) \sigma_A(E) E^{-8} dE \quad (4.17)$$

В данном случае скорость передачи энергии зависит от расстояния как $F_{qq} \propto 1/R^{10}$.

Если a – размер излучающей системы, то при одинаковых условиях резонанса (интергалы перекрытия спектров меняются мало) справедливы следующие отношения для скоростей передачи энергии посредством компонент взаимодействия различной мультипольности [47]:

$$\frac{F_{dq}}{F_{dd}} \propto \left(\frac{a}{R}\right)^2, \quad \frac{F_{qq}}{F_{dd}} \propto \left(\frac{a}{R}\right)^4. \quad (4.18)$$

Таким образом, на больших расстояниях диполь-дипольный механизм передачи энергии является доминирующим, хотя следует отметить, что для расстояний, сравнимых с размером молекул донора и акцептора, диполь-квадрупольный, квадруполь-квадрупольный и диполь-дипольный компоненты вносят сравнимые вклады.

4.5.2. Передача энергии по триплетным состояниям

Передача энергии электронного возбуждения от донора к акцептору может в принципе идти не только по синглетным, но и по триплетным уровням. Декстер [54] рассмотрел такую передачу энергии по триплетным состояниям. Исследовался случай, когда обе молекулы – и донор, и акцептор – имеют нижний триплетный уровень, расположенный между основным и первым возбуждённым синглетными состояниями. Тогда они описываются энергетическими схемами, представленными на рис. 27.

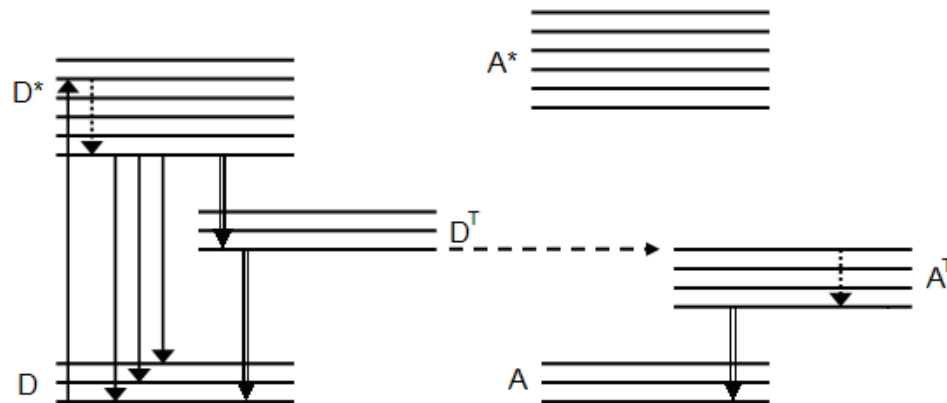


Рис.27. Триплет-триплетная безызлучательная передача энергии от донора (D) к акцептору (A).

Обозначения сходны с рис.24. D, A – донор и акцептор в основном энергетическом состоянии, D*, A* - в первом возбуждённом, D^T, A^T – в триплетном. Каждый из электронных уровней сопровождается несколькими колебательными. Сплошными стрелками показаны процессы поглощения

донором фотона возбуждающего света (характерные скорости $\sim 10^6 \text{ с}^{-1}$) и флуоресценция донора ($\sim 10^8 \text{ с}^{-1}$). Точки показывают колебательную релаксацию частиц с характерными скоростями $\sim 10^{12} \text{ с}^{-1}$. Двойными стрелками изображены процессы перехода донора в триплетное состояние и выхода из него; выхода акцептора из триплетного состояния.

В данном случае, когда и донор, и акцептор являются трёхуровневыми, возможен перенос энергии, осуществляющийся следующим образом. Начальное состояние системы - донор в состоянии $2(T)$, акцептор в состоянии $0(S)$, конечное состояние системы – донор в состоянии $0(S)$, акцептор в состоянии $2(T)$. Этот переход из состояния $D^T A$ в состояние DA^T схематично показан на рис.27 пунктирной стрелкой.

В данном случае в результате переноса энергии меняется спин как донора, так и акцептора. Переходы внутри одной молекулы с изменением спина обусловлены спин-орбитальным взаимодействием в ней. Спин-орбитальное взаимодействие мало, и такие дипольно запрещённые переходы редки. В случае же рассматриваемой передачи энергии по триплетным уровням одновременно изменяется спин обеих молекул, для чего необходимо своего рода межмолекулярное спин-орбитальное взаимодействие. Декстер [54] показал, что в данном случае скорость переноса энергии описывается формулой, которая на первый взгляд аналогична формуле в теории Фёрстера:

$$F_D = \text{const} Z^2 \int I_D(E) \sigma_A(E) \frac{dE}{E^4}. \quad (4.19)$$

Однако здесь матричный элемент Z имеет следующий вид:

$$Z = \langle D_T d^1 A a^0 | V | A_T a^1 D d^0 \rangle = \langle D_T A | V | A_T D \rangle \langle d^1 | d^0 \rangle \langle a^0 | a^1 \rangle. \quad (4.20)$$

Здесь V - оператор диполь-дипольного взаимодействия, D, D_T и A, A_T - электронные волновые функции донора и акцептора в основном и триплетном состоянии, d^0, d^1 и a^0, a^1 - синглетные и триплетные спиновые функции донора и акцептора. Интеграл $\langle D_T A | V | A_T D \rangle$ по величине сравним с интегралом $\langle D^* A | V | A^* D \rangle$ в теории Фёрстера.

В отсутствие спин-орбитального взаимодействия мы имеем $\langle d^1 | d^0 \rangle = \langle a^1 | a^0 \rangle = 0$. При наличии спин-орбитального взаимодействия эти интегралы отличны от нуля, но малы по величине. Фактически матричный элемент Z пропорционален степени перекрытия волновых функций донора и акцептора, т.е. определяется обменным взаимодействием. Поэтому он экспоненциально зависит от расстояния R между донором и акцептором [54]:

$$Z^2 \propto \exp(-2R/L), \quad (4.21)$$

где $L \sim 1 \text{ \AA}$. Обменно-резонансной передачей энергии по триплетным уровням между донором и акцептором можно пренебречь, если $R > 1 \text{ \AA}$.

4.8. Передача энергии между молекулами с помощью экситонов

Теория Фёрстера бытсро прошла многократную экспериментальную проверку [53]. Однако это не избавило её от возражений.

В 1968 году Давыдов опубликовал возражение к Фёрстеровской теории. В работе «Безызлучательная передача энергии электронного возбуждения между примесными молекулами в кристаллах» [55] он утверждал, что золотое правило Ферми, т.е. теория возмущений, на которую и опирается теория Фёрстера, неприменима в случае безызлучательной передачи энергии: теория возмущений справедлива только для времён, много меньших, чем время τ , за которое происходит переход из одного состояния системы в другое. Поэтому, по Давыдову, вместо приближённой формулы золотого правила Ферми

$$P_{ab} = 2\pi \left| \int \psi_b^* V \psi_a d\tau \right|^2 \delta(E_b - E_a), \quad (4.22)$$

где b и a – конечное и начальное состояние систем, V – оператор взаимодействия, P_{ab} – вероятность перехода (в единицах измерения, где $\hbar = 1$), - следует использовать точное решение задачи о взаимодействии двух систем. Он выводит его на основе уравнений для двухуровневых систем и приходит к такому результату:

$$P_{ab} = \frac{2}{\pi} \sqrt{|V_{ab}|^2}. \quad (4.23)$$

Принципиальное отличие (4.23) от (4.22) – первая степень матричного элемента оператора взаимодействия вместо его квадрата. Для диполь-дипольного взаимодействия, благодаря которому осуществляется безызлучательная передача энергии, $V \propto 1/R^3$. Таким образом, по Фёрстеру $P_{ab} \propto 1/R^6$, а по Давыдову $P_{ab} \propto 1/R^3$.

Фёрстер, Декстер и Нокс опубликовали ответ Давыдову в 1969 году [56]. Их статья носит то же название. Они называют подход Давыдова подходом Перрена-Давыдова, так как Ф. Перрен исходил из тех же предположений о существовании точного резонанса между возбуждёнными уровнями двух частиц. Фёрстер и соавторы объясняют, почему в данном случае этот подход неприменим.

Во-первых, в нём не берется в расчёт существование квазинепрерывного из-за наличия фононов энергетического спектра состояний возбуждённого акцептора. Во-вторых, не учитывается быстрая релаксация возбуждённого акцептора к состоянию без фононов и, таким образом, необратимость передачи энергии. У Давыдова вероятность обнаружить ту или иную молекулу в возбуждённом состоянии осциллирует как $\cos^2 vt$ и $\sin^2 vt$, где $v = \sqrt{|V_{ab}|^2}$. То есть возбуждение многократно передаётся туда и обратно между молекулами. При FRET-процессах такого происходить не может из-за практически мгновенной (с характерным временем много меньше времени жизни молекулы в возбуждённом состоянии) релаксации возбуждённого акцептора.

Тем не менее, передача энергии такого типа, как описана Давыдовым, реализуется. В этом случае она носит экситонный характер, так как не является необратимой. Это происходит при сильных взаимодействиях, таких, что их скорость больше скорости колебательной релаксации молекул. Фёрстер и соавторы так и называли систему, описанную Давыдовым: двумолекулярным экситоном.

Согласно современным представлениям, FRET – частный случай передачи энергии электронного возбуждения, которая может реализовываться и другими механизмами.

4.7. Проблемы, возникающие при исследовании FRET в ансамблях молекул

Выше обсуждались вопросы теории безызлучательной передачи энергии электронного возбуждения от одиночного донора к одиночному акцептору. Однако возможность эксперимента с подобными одиночными парами появилась относительно недавно (1999 год, [58] см. ниже). До этого эксперименты могли проводиться только с ансамблями молекул – доноров и акцепторов. При исследованиях передачи энергии в ансамблях возникали дополнительные сложности, связанные с необходимостью учёта взаимодействий и усреднения результатов по всем возможным парам внутри ансамбля.

Рассмотрим, как теорию FRET необходимо было модифицировать для случая «жёстких растворов» - таких, в которых доноры и акцепторы не меняют своего взаимного расположения и ориентации за время проведения эксперимента.

Концентрацию возбуждённых доноров обычно можно считать достаточно малой [59], так что каждый из них можно рассматривать независимо от других. Данное предположение верно при слабом источнике возбуждения. Тогда необходимо учесть взаимодействие каждого донора с каждым акцептором. В работах [60, 61] это было сделано следующим образом.

Вероятность того, что в данный момент времени t перенос энергии от одиночного донора к одиночному акцептору в объёме dV на расстоянии R от донора ещё не осуществился, составляет [59]

$$dW_{D \rightarrow A} = \exp(-F(R)t) \frac{dV}{V}, \quad (4.24)$$

где $F(R)$ – скорость передачи энергии на расстоянии R . При FRET-процессах она определяется выражением (4.8). Здесь пока не рассматривается уход донора из возбуждённого состояния посредством собственной флуоресценции, это будет сделано позже. Если имеется N независимых акцепторов в элементах объёма $dV_1, dV_2, \dots, dV_i, \dots, dV_N$, то вероятность передачи энергии одиночным донором множеству акцепторов будет представлять собой произведение функций типа (4.24), $dW_N = \prod_{i=1}^N dW_i$. Затем эту вероятность необходимо усреднить по числу доноров. Если считать распределение доноров случайным и пренебречь конечным объёмом акцепторов, то это усреднение эквивалентно интегрированию по всем dV_i , так как разные доноры отличаются тогда только расположением акцепторов относительно них. Все эти интегралы будут одинаковы, опять же, в связи с предположением о бесконечно малом объёме акцепторов. На основании этих рассуждений приходим к выражению [59]

$$W(t)_{1D-NA} = \left(\frac{1}{V} \int_V \exp(-F(R)t) dV \right)^N. \quad (4.25)$$

Если обозначить $x = 1 - \frac{1}{V} \int_V \exp(-F(R)t) dV$, и учесть, что объём V велик по сравнению с расстояниями R между соседними молекулами, можно воспользоваться подстановкой $1 - x \approx e^x$, так как величина x мала: $\exp(-F(R)t)$ меньше единицы только в небольшой области пространства около $R=0$. Тогда средняя вероятность отсутствия передачи энергии от любого донора к любому акцептору [59]

$$\begin{aligned} W(t)_{ND-NA} &= \left[\exp \left(\frac{1}{V} \int_V \exp(-F(R)t) dV - 1 \right) \right]^{N_A} = \exp \left(\frac{N_A}{V} \left(\int_V \exp(-F(R)t) dV - V \right) \right) = \\ &= \exp \left(-c_A \int_V (1 - \exp(-F(R)t)) dV \right) \end{aligned} \quad (4.26)$$

где c_A – число акцепторов в единице объёма.

Если учесть, что число возбуждённых доноров уменьшается не только из-за передачи энергии, но и из-за донорной флуоресценции, получим следующее уравнение для числа возбуждённых доноров [59]:

$$n_D(t) = n_0 \exp \left[-\frac{t}{T_D} - c_A \int_V (1 - \exp(-F(R)t)) dV \right]. \quad (4.27)$$

Здесь n_0 – число первоначально возбуждённых доноров, $1/T_D$ – скорость донорной флуоресценции. Вычисление интеграла $\int_V (1 - \exp(-F(R)t)) dV$ приводит к следующему уравнению «кинетики затухания числа доноров» [59]:

$$n_D(t) = n_0 \exp \left[-\frac{t}{T_D} - \text{const} \cdot c_A R_0^3 \sqrt{\frac{t}{T_D}} \right]. \quad (4.28)$$

Здесь R_0 – радиус Фёрстера. Выражение (4.28) было первоначально выведено Фёрстером [52] с использованием нескольких предположений: о малой концентрации возбуждённых доноров, о бесконечно малом объёме акцепторов, о способности акцептора принять энергию электронного возбуждения с бесконечно малой задержкой во времени между двумя актами передачи энергии. Что касается малой концентрации возбуждённых доноров, это условие легко выполнимо: достаточно возбуждать донор слабо. Второе предположение, о бесконечно малом объёме акцептора, было частично снято в работах [62, 63] – там был учён так называемый «запрещённый объём», что привело к изменению формулы для кинетики затухания доноров по сравнению с (4.28). С этим уточнением затухание становится неэкспоненциальным. Уточнение не играет роли для случая $\left(\frac{R_0}{R_A + R_D} \right)^6 \frac{t}{T_D} \ll 1$ [59]. Третье предположение, лежащее в основе выражения (4.28) – об отсутствии «выбывания акцепторов из игры» - приводит к дополнительному отклонению реального закона затухания доноров от выражения (4.28).

Выражение для «кинетики высвечивания акцепторов», выведенное с учётом упомянутых выше предположений, выглядит следующим образом [46, 64]:

$$n_A(t) = \text{const} \cdot q \cdot \exp(-q^2) \left\{ A \left(q + \sqrt{\left(\frac{1}{T_D} - \frac{1}{T_A} \right) t} \right) - A(q) \right\} \exp\left(-\frac{t}{T_A}\right), \quad (4.29)$$

где $q = \text{const} \cdot c_A R_0^3 \left(1 - \frac{T_D}{T_A}\right)^{\frac{1}{2}}$, $A(q) = \int_0^q \exp(-x^2) dx$.

Выше обсуждался случай жёстких растворов, в которых молекулы донора и акцептора неподвижны. В вязких растворах – таких, где молекулы меняют взаимное расположение и ориентацию – необходимо также учесть диффузию доноров и акцепторов. Это было сделано в работах [65-68]. Здесь соответствующие формулы приведены не будут, так как это лежит за рамками цели данного параграфа обзора – а именно, продемонстрировать, что при исследовании FRET в донор-акцепторных ансамблях возникает множество сложностей, связанных с необходимостью различных усреднений.

4.8. FRET в одиночных донор-акцепторных парах

Как обсуждалось выше, обработка экспериментальных данных по ансамблям доноров и акцепторов существенно усложнялась в связи с необходимостью различных усреднений и учёта взаимодействий многих молекул. Возможность исследования передачи энергии в одиночной донор-акцепторной паре, которая появилась с развитием спектроскопии одиночных молекул в 1990-х годах, позволила применять теорию Фёрстера, описанную в параграфе 4.5, напрямую, без модификаций, описанных в параграфе 4.11. Это явилось прорывом в области FRET.

Кроме того, исследование одиночной донор-акцепторной пары позволяет наблюдать флуктуации флуоресценции, которые сглаживаются из-за усреднений при исследовании ансамблей. Как было показано во второй главе диссертации, такие флуктуации являются источником важной информации о квантовой динамике молекул.

Группа Вейсса

Первая работа, экспериментально исследовавшая FRET в одиночной донор-акцепторной паре, была опубликована в 1996 году [69]. В этой работе исследовались одиночные доноры (тетраметилпродамин) и акцепторы (техасский красный), прикрепленные к концам короткой молекулы ДНК с 10 или 20 основаниями. Доноры и акцепторы исследовались как в паре, так и по отдельности. Таким образом регистрировалась флуоресценция от шести типов одиночных объектов: Д-10, А-10, Д-10-А, Д-20, А-20, Д-20-А, где числа 10 и 20 обозначают число оснований молекулы ДНК.

Вейсс и соавторы использовали ближнепольный микроскоп для возбуждения донора. При этом поглощение акцептора на данной длине волны возбуждения (514 нм) не было равно нулю. Следовательно, помимо сенсibilизированной флуоресценции акцептора (возбуждение акцептора исключительно через возбуждение донора и передачу энергии), присутствовало и прямое возбуждение акцептора. В этом состояла одна из сложностей: различить флуоресценцию акцептора за счёт передачи энергии и за счёт собственного возбуждения.

Авторы работы [69], помимо экспериментов с одиночными молекулами и парами, провели традиционные ансамблевые измерения. Они получили эффективность передачи энергии 65% для случая Д-10-А и 32% для Д-20-А.

Что касается одиночных молекул, то, во-первых, были сняты спектры флуоресценции отдельных молекул: Д-10, А-10, Д-20 и А-20. Пики (566.4 ± 9.1 нм и 601.6 ± 12.2 нм для Д-10 и А-10) и полуширины спектров имеют существенный разброс из-за неоднородного уширения, вносимого разным локальным окружением. Тем не менее, разница между пиками доноров и акцепторов в три раза превышает неопределённость их позиций, что позволяет легко отличить донорную флуоресценцию от акцепторной.

Во-вторых, авторы [69] получили двухцветные изображения образцов с парами, Д-10-А и Д-20-А. Они представлены на рис.28.

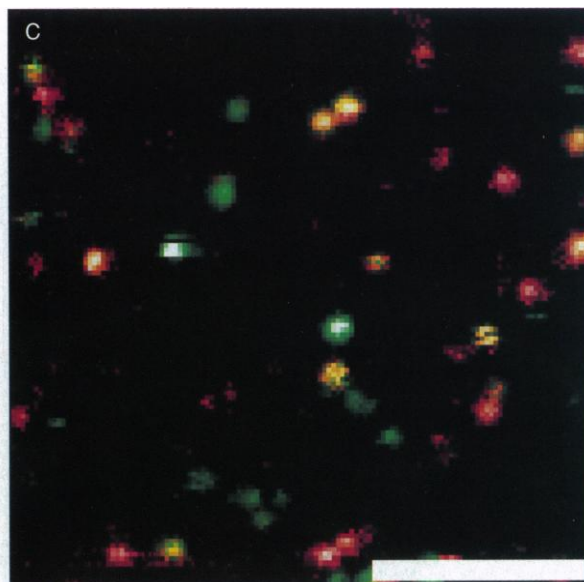


Рис.28. Двухцветные изображения донор-акцепторной пары, прикреплённой к ДНК с 10 основаниями, полученные Вейссом и соавторами в работе [69]. Масштаб – линия 1 мкм.

Здесь зелёные точки – флуоресценция донора, красные – флуоресценция акцептора, жёлтые – флуоресценция обеих молекул пары, расположенных достаточно близко и имеющих сравнимую интенсивность. Так как жёлтые точки свидетельствуют о передаче энергии, Вейсс и соавторы измерили спектры этих «жёлтых» объектов. Большей частью эти спектры имели двухпиковую структуру, чётко отличавшуюся от спектра одиночной молекулы. Оказалось, что для комплексов Д-20-А спектр может быть удовлетворительно смоделирован суммой спектров донора и акцептора, в то время как для комплексов Д-10-А представить спектр как сумму двух не удаётся. Авторы объясняют этот контраст тем, что в комплексах Д-20-А взаимодействие, по-видимому, достаточно слабое для того, чтобы не исказить индивидуальные спектральные характеристики молекул. В этом случае оно может быть описано теорией Фёрстера. В комплексах же Д-10-А взаимодействие сильное, типа обменного, описанного Декстером.

Акцепторная флуоресценция, как отмечалось выше, может быть вызвана передачей энергии или прямым возбуждением акцептора. Различить эти два

случая – проблема, которая стоит перед экспериментаторами. Авторы [69] решают эту проблему с помощью наблюдения фотообесцвечивания донора или акцептора. Если первым обесцвечивается акцептор, интенсивность донорной флуоресценции возрастает, если передача энергии осуществлялась, и остаётся прежним, если акцептор возбуждался напрямую, а не через передачу энергии. Если первым обесцвечивается донор, то интенсивность акцепторной флуоресценции после этого равна интенсивности флуоресценции в результате непосредственного возбуждения акцептора. Исходя из этого, авторы [69] рассчитывают эффективность передачи энергии в комплексах Д-20-А. При этом от пары к паре наблюдается огромный разброс, от 16% до 85%. Что касается максимальной величины, 85%, авторы затрудняются объяснить её, предполагая нарушение гибридизации ДНК (разъединение двух цепочек) или другое искажение формы, позволяющее донору и акцептору сблизиться на очень малые расстояния.

Авторы работы [69] подчёркивают, что её целью было продемонстрировать, что передача энергии может быть исследована на уровне одиночных молекул. Впоследствии группа Вейсса развивала данную тематику. В данном обзоре будет рассмотрена ещё одна их работа [58].

Методы спектроскопии одиночных молекул позволяют наблюдать флуктуации флуоресценции, скрытые при экспериментах с ансамблями из-за усреднения по всем молекулам. Однако в работе [69] в качестве таких флуктуаций рассматривалось только фотообесцвечивание отдельных молекул. В более поздней работе [58] тех же авторов, Вейсса и др., флуктуации различного типа рассматривались более подробно.

В качестве донора был использован тетраметилпродамин с максимумом флуоресценции 570 нм, в качестве акцептора – молекулы Су5 с максимумом флуоресценции 670 нм. По сравнению с работой [55], такой выбор доноров и акцепторов облегчал задачу экспериментаторов, так как, во-первых, акцептор практически не возбуждался напрямую, а во-вторых донорную и акцепторную флуоресценцию было легче разделить. Молекулы донора и

акцептора были прикреплены к молекуле стафилококковой нуклеазы. Её диаметр $\sim 40\text{\AA}$, в то время как Фёрстеровский радиус для данной донор-акцепторной пары составляет 53\AA (если считать ориентационный фактор $K^2 = 2/3$). Поэтому ожидалась большая величина эффективности передачи энергии, более 70%.

Данный донор прикрепляется только к определённому радикалу в составе данного белка (*specific labeling*). Акцепторы же не обладают такой избирательностью. Поэтому выход реакции присоединения акцепторов был специально сделан малым, так, что только 15-20% молекул белка оказались маркированы акцепторами. Это позволило избежать появления нескольких меток на одном белке и гарантировать, что изучаемый объект – действительно одиночная донор-акцепторная пара.

Авторы [58] измерили квантовые траектории интенсивности донора и акцептора. В этих траекториях проявили себя три вида флуктуаций. Во-первых, мерцания донора и акцептора из-за попадания акцептора в триплетное состояние (характерные времена мерцаний порядка 10^{-3} с). Во-вторых, мерцания донора и акцептора на более длительных временах, порядка 10^{-1} с. В-третьих, фотообесцвечивание донора и акцептора.

Авторов работы [58] интересовали только флуктуации скорости передачи энергии, связанные с изменением расстояния между молекулами донора и акцептора. Мерцания флуоресценции являются для них «шумом», поэтому авторы сглаживают их с помощью медианного фильтра.

На рис.29 представлены измеренные (слева) и сглаженные (справа) сигналы. На сглаженных сигналах не присутствуют мерцания молекул, и именно по ним рассчитывается эффективность передачи энергии (справа внизу). Однако на самом деле эти мерцания несут в себе важную информацию, которая может быть использована для нахождения корректного значения эффективности передачи энергии. Подробнее см. параграф 5.6.

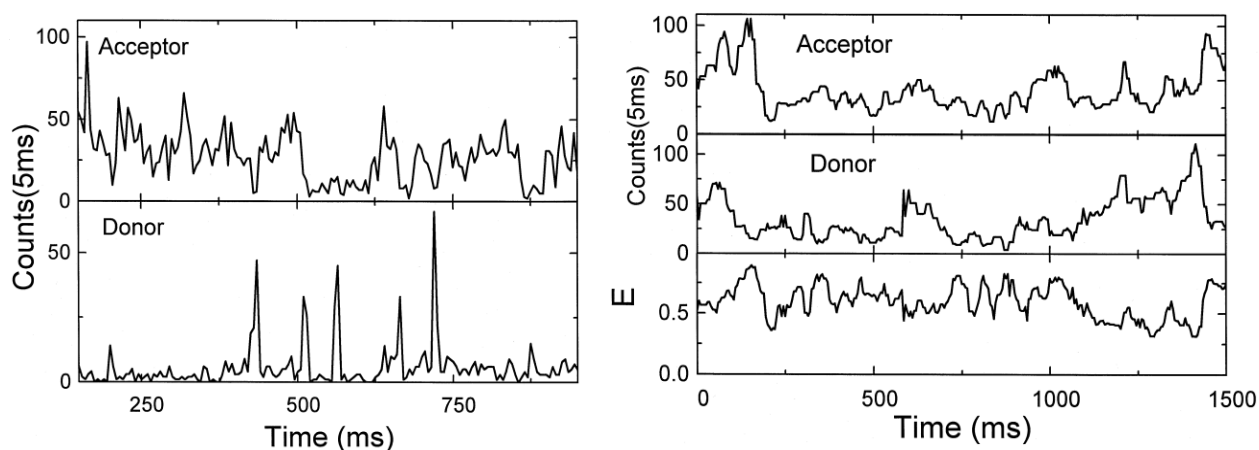


Рис.29. Квантовые траектории интенсивности флуоресценции донора и акцептора, измеренные экспериментально (слева) и сглаженные с помощью медианного фильтра (справа). Нижняя панель справа – эффективность передачи энергии, рассчитанная с помощью сглаженных траекторий. Данные работы [58].

Вейсс и соавторы, обрабатывая данные, сглаженные с помощью медианного фильтра, получили эффективность передачи энергии $\sim 70\%$. Однако, так как авторы работы исключили из рассмотрения мерцания флуоресценции, можно предположить, что эта величина завышена. Авторы [58] не учли тот факт, что когда акцептор попадает в тёмное состояние, он становится неспособен принять энергию донора. Вследствие этого донор в это время светит интенсивно, так как “конкурирующий” с донорной флуоресценцией процесс передачи энергии не осуществляется во время пребывания акцептора в тёмном состоянии. Off-интервалы обеих молекул в таком случае антикоррелируют во времени. Авторы работы [44] отмечают такую антикорреляцию в полученных ими данных. То есть, рассмотренный в работе [58] случай относится именно к такой категории.

Тёмные состояния акцептора, таким образом, препятствуют полной передаче энергии. В данной диссертации развита теория, позволяющая учесть этот факт.

Группа Гопич

Флуктуации флуоресценции одиночной донор-акцепторной пары изучались и теоретически, например, в работах Гопич и Сабо [70-74]. Однако их подход кардинально отличается от принятого в данной диссертации. Они рассчитывали флуктуации эффективности передачи энергии, в то время как в данной диссертации рассчитывается влияние случайных переходов молекул донора и акцептора в тёмные состояния на среднее значение передачи энергии.

В работе [70] Гопич и Сабо рассмотрели следующие случаи донор-акцепторного взаимодействия. Во-первых, простейший, описываемой схемой? представленной на рис.25. Во-вторых, случай, когда возможно повторное возбуждение донора при том, что акцептор находится в возбуждённом состоянии (к схеме на рис. 25 добавляется ещё один уровень). В-третьих, конформационная динамика: возможность донора и акцептора сближаться и отдаляться, при этом скорость передачи энергии “прыгает” между двумя значениями. Кроме того, рассматриваются неподвижные и диффундирующие донор и акцептор.

Для первых двух случаев авторы работы [70] считают распределение числа фотонов на интервале накопления сигнала пуассоновским. Это является допущением, как подчёркивают сами авторы. Точное выражение для распределения числа фотонов дано в работе [30]. При слабом возбуждении ($k \ll 1/T_{D,A}$) это допущение справедливо. Гопич и Сабо предлагают записывать функцию распределения $W(E,t)$ для эффективности E передачи энергии на интервале t накопления сигнала в виде

$$W(E,t) = \sum_{N_A, N_D}^{\infty} W(N_D, N_A, t) \cdot \delta\left(E - \frac{N_A}{N_A + N_D}\right), \quad (4.30)$$

где $W(N_D, N_A, t)$ - распределение числа N_D фотонов донора и N_A фотонов акцептора на времени t накопления сигнала. Авторы [56] аппроксимируют распределение (4.30) гауссианой и β -распределением. Каждая из этих

функций удовлетворительно описывает зависимость (4.30) на определённом интервале.

Для остальных случаев Гопич и Сабо разделяют быстрые (накачку донора, передачу энергии и флуоресценцию донора и акцептора) и медленные (переходов в триплет, конформационной динамики и диффузии молекул относительного лазерного пятна) процессы. Все медленные процессы ведут к кардинальному отклонению распределений фотонов от пуассоновского, поэтому авторы [70] рассматривают их совокупно.

Авторы [70] вводят переменную r , описывающую коллективно все медленные процессы. При фиксированном значении r распределение фотонов считается пуассоновскими со средними числами фотонов $n_d(r)$ и $n_a(r)$. Распределение числа фотонов N' с учётом только медленных процессов подчиняется закономерности

$$W'(N'_D, N'_A, t) = \left\langle \delta \left(N'_D - \int_0^t n_D(r(x)) dx \right) \delta \left(N'_A - \int_0^t n_A(r(x)) dx \right) \right\rangle. \quad (4.31)$$

С учётом быстрых процессов распределение фотонов описывается манделевской формулой [70]

$$W(N_D, N_A, t) = \int_0^\infty W'(N'_D, N'_A, t) \frac{N_D'^{N_D}}{N_D!} \frac{N_A'^{N_A}}{N_A!} \exp(-N'_D - N'_A) dN'_D dN'_A. \quad (4.32)$$

Формула (4.32) описывает распределение числа фотонов донора и акцептора N_D и N_A в подходе Гопич и Сабо, рассматривающем отдельно быстрые и медленные процессы. В качестве медленных процессов, как уже упоминалось, могут выступать переходы между синглетными и триплетными состояниями, изменение расстояния между донором и акцептором и, следовательно, изменение средней скорости передачи энергии, а также диффузия пары относительно луча возбуждающего лазера.

Подставляя (4.32) в (4.30) и вводя переменные $\varepsilon = \frac{N_A}{N_A + N_D}$, $N = N_A + N_D$

можно получить формулу для распределения эффективности передачи энергии с учётом медленной динамики:

$$W(E, t) = \int_0^1 \int_0^1 \frac{\rho(E, \varepsilon, N) W_{en}(\varepsilon, N, t) N_p(N)}{N_{en}(t)} d\varepsilon dN, \quad (4.33)$$

где

$$\rho(E, \varepsilon, N) = \frac{1}{N_p(N)} \sum_{ND, NA} \frac{[\varepsilon N]^{NA}}{N_A!} \frac{[(1-\varepsilon)N]^{ND}}{N_D!} \exp(-N) \delta(E - \varepsilon),$$

$$N_p(N) = \sum_{ND, NA} \frac{[\varepsilon N]^{NA}}{N_A!} \frac{[(1-\varepsilon)N]^{ND}}{N_D!} \exp(-N),$$

$$W(\varepsilon, N, t) = \left\langle \delta\left(\varepsilon - \int_0^t \frac{n_A(r(x))}{N} dx\right) \delta\left(N' - \int_0^t [n_A(r(x)) + n_D(r(x))] dx\right) \right\rangle,$$

$$N_{en}(t) = \int_0^1 \int_0^1 W_{en}(\varepsilon, N, t) N_p(N) d\varepsilon dN.$$

Авторы [70] называют выражение (4.33) ключевым результатом своей работы. Оно позволяет в общем случае (когда присутствует медленная и быстрая динамика донор-акцепторной пары) рассчитать среднюю эффективность E передачи энергии и дисперсию её распределения, а в некоторых частных случаях и само распределение E аналитически.

В работе [70] показано, что в случае перехода между двумя конформациями распределения получаются двухпиковыми.

Диффузия донор-акцепторной пары рассмотрена в статье весьма подробно, в том числе и в сочетании с другими процессами, например, с изменением конформаций. Обсуждение этой части работы лежит за рамками данного обзора.

В 2009 году те же авторы, Гопич и Сабо, предложили альтернативный подход к обработке экспериментально полученных последовательностей фотонов. Он основан на использовании функции правдоподобия (likelihood function) [71]. Эффективность передачи энергии в каждой конформации и вероятность скорости переходов между конформациями при этом могут быть найдены без учёта времени накопления сигнала. Этот метод работает, если есть возможность экспериментально регистрировать время каждого отдельного фотона.

Подход, развитый в работе [71] и опирающийся на разделение быстрых и медленных процессов, был затем применён Гопич, Сабо и соавторами в работе 2009 года к анализу автокорреляционных функций интенсивности флуоресценции одиночных донор-акцепторных пар, прикрепленных к белку с целью извлечения информации о его конформационной динамике. Когда присутствует разделение процессов на быстрые и медленные, авторы [72] предлагают представить автокорреляционную функцию флуоресценции как произведение автокорреляционных функций, соответствующих быстрым и медленным процессам. Таким образом, имея экспериментально измеренную АКФ и предполагая распределение фотонов пуассоновским с известным средним для быстрых процессов, можно извлечь информацию о скорости медленных процессах, таких, как изменение расстояния между молекулами пары. Триpletные уровни молекул в данной работе специально не рассматривались.

В работе 2010 года [73] Гопич и Сабо развили подход, подробно изложенный в [70]. А именно, они нашли способ приближённо вычислить распределения эффективности передачи энергии (4.33) для случая молекулы с несколькими конформационными состояниями. В работе [73] предполагается, что в каждой конформации фотоны флуоресценции донора и акцептора подчиняются пуассоновской статистике, а также что среднее суммарное число фотонов постоянно для всех конформаций. Авторы [73] аппроксимируют выражение (4.33) суммой гауссиан, вес каждой из которых, а также среднее и дисперсия являются функциями скоростей переходов в системе.

В 2011 году была опубликована одна из экспериментальных работ [74], в которой используются теоретические работы [70-73]. К белку были прикреплены донор и акцептор. По их флуоресценции определяли скорости сворачивания и разворачивания белка. Эксперимент выполнялся двумя способами. В первом случае исследуемый комплекс свободно диффундировал сквозь объём, освещаемый возбуждающим лазером, и регистрировались

серии фотонов. Во втором случае белок был зафиксирован на поверхности, а флуоресценция регистрировалась вплоть до фотообесцвечивания донора или акцептора. Авторы [74] использовали два метода. Во-первых, метод максимума функции правдоподобия, предложенный в работе [71]. Способность этого метода описывать данные для систем с двумя конформациями была проверена с помощью процедуры «перекраски» (recoloring) фотонов, также подробно описанной в работе [71]. Распределение эффективности передачи энергии для «перекрашенных» фотонов затем сравнивалось с полученным экспериментально. Совпадение оказалось высоким. Во-вторых, авторы [74] использовали метод приближённого описания распределения эффективности передачи энергии с помощью суммы нескольких (в данном случае трёх) гауссиан, как было предложено в работе [73]. При этом распределения эффективности передачи энергии строились в зависимости от времени накопления сигнала, которое варьировалось.

Группа Баше

Группа Томаса Баше использовала другой подход к анализу передачи энергии. В 2004 году они экспериментально исследовали дендример, состоящий из одного террилен-диимида (Т, акцептора), расположенного в центре, и четырёх перилен-моноимидов (Р, доноров), окружающих его [75].

Так как рассматривалась мультихромофорная система с несколькими донорами, передача энергии могла происходить не только от каждого донора к акцептору, но и между донорами в определённом направлении – от более «синего» к более «красному». Вероятность передачи энергии $P \rightarrow T$ в среднем существенно больше, чем $P \rightarrow P$. Однако возможны такие конформации дендримера, когда доноры сближаются так сильно, что вклады двух процессов становятся сравнимы. Этот случай не учитывался в работе [75], так как с помощью спектров флуоресценции системы было установлено, что это маловероятно.

Цель работы состояла в определении скорости передачи энергии от каждого донора к акцептору. Это осуществлялось следующим образом. Был

измерен спектр поглощения дендримера (T_1P_4) в диапазоне поглощения доноров (P). Измерение проводилось при температуре 1.4К. Низкая температура позволяла наблюдать бесфононные линии отдельных доноров. Каждая бесфононная линия моделировалась лоренцианом с шириной $\Delta\nu$ порядка нескольких десятков гГц. Ширина бесфононной линии определяется несколькими факторами: естественной шириной линии, дефазировкой, спектральной диффузией и, в данном случае, временем передачи энергии от донора к акцептору. Авторы [75] предположили, что последний фактор является доминирующим. Чтобы доказать это, они измерили также спектры поглощения схожих дендримеров с двумя или четырьмя хромофорами P, но без акцептора T. В таких спектрах ширина бесфононной линии определялась исключительно шириной лазерной линии ~ 2 гГц. Поэтому они заключили, что среднее время передачи энергии можно с достаточно высокой точностью найти с помощью $\Delta\nu$:

$$\tau = 1 / F = \frac{1}{2\pi\Delta\nu}. \quad (4.34)$$

Согласно их экспериментальным данным, средняя скорость F передачи энергии получается равной порядка 10^{11} с^{-1} . Это значение скорости велико, и заставляет предполагать наличие не только фёрстеровского взаимодействия между донором и акцептором. Авторы [75] также упоминают о возможности более интенсивного обменного взаимодействия. Однако они исходят не из большой величины скорости передачи энергии, а из того факта, что измерения при комнатной и низкой (1.4К) температуре показали практически одинаковые по порядку величины скорости передачи энергии. В случае фёрстеровского взаимодействия скорость передачи энергии зависит от интеграла перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора, который растёт с ростом температуры. Таким образом, если бы взаимодействие было бы только FRET-типа, то при низкой температуре средняя скорость передачи энергии была бы существенно ниже.

В работе [76] 2005 года группа Баше применила методику измерений флуоресценции, разрешённых во времени (time-resolved fluorescence measurements), а именно TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting). Сущность метода в следующем. Молекулу возбуждают очень коротким импульсным излучением лазера (настолько коротким, что его длительностью можно пренебречь по сравнению с временем жизни молекулы в возбуждённом состоянии). После этого регистрируют время испускания отдельных фотонов. TCSPC обычно используют для малых интенсивностей флуоресценции, так что излучением нескольких фотонов на отрезке времени, соответствующем временному разрешению установки, можно пренебречь. Таким образом получают распределение времени жизни молекулы в возбуждённом состоянии.

В работе [76] Баше и соавторы экспериментально исследовали донор-акцепторную пару, состоящую из перилендиимида (донор) и террилендиимида (акцептор). Донор и акцептор были прикреплены к жёстким «разделителям»-олигофенилам так, что расстояние между донором и акцептором, а также углы между их дипольными моментами оставались неизменными на всём времени наблюдения. Кроме того, эти расстояния и углы известны для каждого «разделителя», поэтому их можно произвольно подбирать, варьируя эффективность передачи энергии. Выбор донора и акцептора определялся, во-первых, их высоким квантовым выходом (близким к единице). Во-вторых, акцептор такой пары обладает значительно большей флоростабильностью, чем донор. Возбуждение осуществлялось таким образом, чтобы существовала вероятность прямого возбуждения акцептора. Таким образом, после фотообесцвечивания донора акцептор продолжал флуоресцировать за счёт этого прямого возбуждения. Это позволило сравнить распределение фотонов акцептора по времени, полученное с помощью метода TCSPC, до фотообесцвечивания донора (передача энергии + прямое возбуждение) и после (только прямое возбуждение). В работе [76] предполагается, что спад (decay) распределения времён при наличии передачи

энергии биэкспоненциален, а разница в спадах распределений с передачей энергии и без неё определяется одной их экспонент. Экспериментальные данные подтверждали это предположение в данном случае – спад распределения времён после фотообесцвечивания акцептора был строго экспоненциален. Показатель экспоненты – произведение средней скорости передачи энергии на время, отсюда определялась скорость передачи энергии. Авторы [76] исследовали 51 одиночную донор-акцепторную пару и построили распределение скоростей передачи энергии в разных парах. Распределение получилось широким ($\tau = 1/F = 61 \pm 18$ пс) из-за неоднородного уширения. Скорость передачи энергии здесь опять, как и в работе [75], слишком большая для того, чтобы передача энергии была чисто фёрстеровская, что отмечают Баше и соавторы.

Глава 5. Флуктуирующая флуоресценция одиночной донор-акцепторной пары

В данной главе будут рассматриваться флуктуации интенсивности флуоресценции одиночной пары молекул, где возможна передача энергии электронного возбуждения от донора к акцептору. Такая передача энергии может реализовываться посредством механизма FRET или любого другого.

С помощью аналитических расчётов и компьютерного моделирования по методу Монте-Карло в данной главе будет показано, что особенности энергетической схемы (двухуровневая или трёхуровневая схема) одной молекулы влияют на тип флуоресценции (мерцающая или непрерывная) другой молекулы пары. Так, двухуровневый акцептор может начать мерцать из-за наличия тёмного состояния у донора, а трёхуровневый донор – прекратить мерцать, взаимодействуя с двухуровневым акцептором.

Поведение молекул зависит от скорости передачи энергии, т.е. от того, насколько процесс передачи энергии вероятен по сравнению с остальными переходами внутри системы. Флуктуации интенсивности флуоресценции донора и акцептора исследованы в рамках данной диссертационной работы в зависимости от скорости передачи энергии. Рассчитаны старт-стоп корреляторы молекул и их распределения числа фотонов флуоресценции. Кроме того, с помощью метода Монте-Карло смоделированы флуктуации, которые могут напрямую наблюдаться в случае разных типов донор-акцепторных пар и при разной скорости передачи энергии. Вид таких флуктуаций позволяет определить тип пары, которая флуоресцирует. На этом примере показано, каким образом можно установить соответствие между типом пары и характером флуктуаций.

Наконец, показано, что выражение для эффективности передачи энергии (4.11), используемое обычно в экспериментах, применимо только для случая, когда акцептор не имеет тёмного (триплетного) состояния, или когда переходы акцептора в триплетное состояние не эффективны. В противном

случае формулу (4.11) следует заменить формулами, выведенными в параграфе 5.5 данной главы.

Будут рассмотрены следующие типа донор-акцепторных пар: двухуровневый донор и двухуровневый акцептор (2Д-2А), трёхуровневый донор и двухуровневый акцептор (3Д-2А), двухуровневый донор и трёхуровневый акцептор (2Д-3А), трёхуровневый донор и трёхуровневый акцептор (3Д-3А).

5.1. Флуктуации флуоресценции двухуровневого донора и двухуровневого акцептора (2Д-2А пара)

Рассмотрим простейший случай: двухуровневый донор взаимодействует с двухуровневым акцептором, система подвергается накачке со скоростью k в спектральной области поглощения донора. Схема такой системы представлена на рис.26. На этой схеме не представлено ещё одно возможное состояние: и донор, и акцептор возбуждены. Это возможно, если система находилась в состоянии 2, а затем донор поглотил фотон лазерного излучения быстрее, чем акцептор испустил фотон флуоресценции. Однако вероятность попасть в такое состояние из состояния 2 равна $k/(k+A)$. Для расчётных параметров, принятых далее в этой главе

$$k = 10^6 c^{-1}, A = 10^8 c^{-1}, D = 2 \cdot 10^8 c^{-1} \quad (5.1)$$

эта вероятность составляет порядка 0.01. Поэтому этим четвёртым уровнем можно пренебречь.

Чтобы рассчитать старт-стоп корреляторы и функции распределения числа фотонов донора и акцептора, необходимо записать балансные уравнения для бимолекулярной системы, схематично изображённой на рис. 26:

$$\begin{aligned} \dot{\rho}_0 &= -k\rho_0 + D\rho_1 + A\rho_2 \\ \dot{\rho}_1 &= k\rho_0 - (D+F)\rho_1 \\ \dot{\rho}_2 &= F\rho_1 - A\rho_2 \end{aligned} \quad (5.2)$$

Метод нахождения старт-стоп корреляторов и функций распределения фотонов для молекул пары аналогичен методу нахождения тех же функций для одиночной молекулы. Этот метод был описан в параграфе 2.3 главы 1.

Все величины ρ_i в уравнениях (5.2) зависят от времени t . В системе уравнений (3) полная вероятность сохраняется: $\sum_i \dot{\rho}_i = 0$. Это уравнения для так называемой закрытой системы – уход из неё считается невозможным, то есть не присутствует никаких переходов, кроме описанных уравнениями (5.2).

Пусть в нулевой момент времени $t_0 = 0$ донор испустил фотон флуоресценции. Найдём вероятность того, что донор НЕ испустит следующий фотон к моменту времени $t_1 = t$. Для этого в уравнениях (5.2) необходимо опустить член, отвечающий за наблюдаемый переход $1 \rightarrow 0$:

$$\begin{aligned}\dot{W}_0^D &= -kW_0^D + 0 + AW_2^D \\ \dot{W}_1^D &= kW_0^D - (D + F)W_1^D \\ \dot{W}_2^D &= FW_1^D - AW_2^D\end{aligned}\quad (5.3)$$

Здесь “0” в первом уравнении показывает, какой именно член системы (5.2) был опущен. Полная вероятность в системе (5.3) не сохраняется: $\sum_i \dot{W}_i^D = -DW_1 \neq 0$, т.к. уравнения (5.3) описывают все процессы, кроме одного, наблюдаемого: перехода $1 \rightarrow 0$ с излучением фотона флуоресценции донора. Поэтому сумма $-\sum_i \dot{W}_i^D = DW_1$ определяет вероятность излучения фотона. А именно, она равна плотности вероятности $s^D(t)$ обнаружить фотон флуоресценции донора через временной интервал t после излучения донором предыдущего фотона, или старт-стоп коррелятору донора.

Аналогично для флуоресценции акцептора уравнения

$$\begin{aligned}\dot{W}_0^A &= -kW_0^A + DW_1^A + 0 \\ \dot{W}_1^A &= kW_0^A - (D + F)W_1^A \\ \dot{W}_2^A &= FW_1^A - AW_2^A\end{aligned}\quad (5.4)$$

позволяют найти старт-стоп коррелятор акцептора $s^A(t) = -\sum_i \dot{W}_i^A = AW_2$.

Решения уравнений (5.3) и (5.4) приводят к старт-стоп корреляторам $s^D(t)$ и $s^A(t)$, представленным на рис.30.

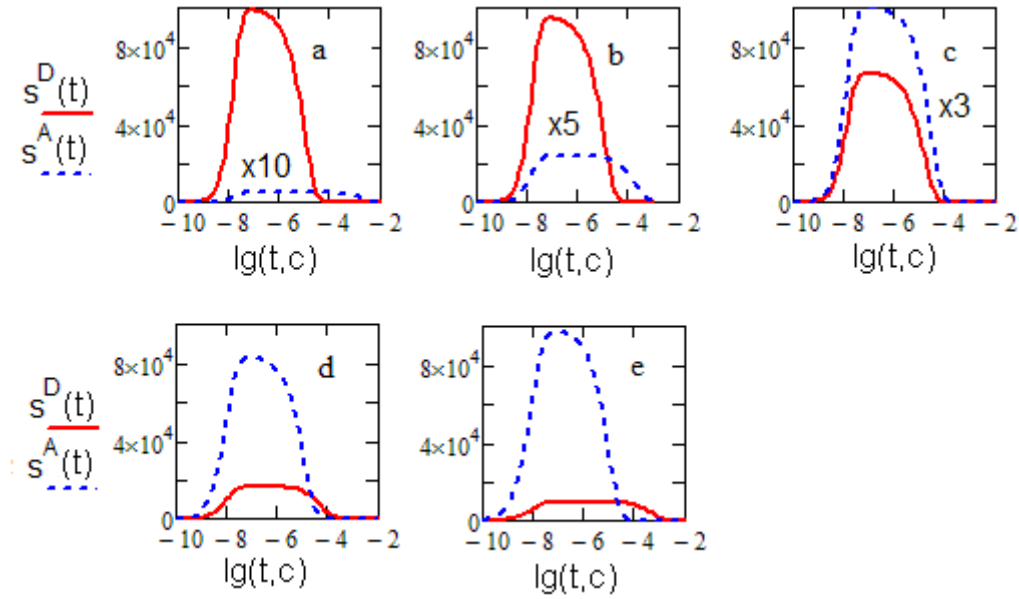


Рис.30. Старт-стоп корреляторы двухуровневого донора (красная сплошная линия) и двухуровневого акцептора (синяя пунктирная линия) при скоростях процессов (5.1). а) $F = 10^6 c^{-1}$ б) $F = 10^7 c^{-1}$ в) $F = 10^8 c^{-1}$ г) $F = 10^9 c^{-1}$ д) $F = 10^{10} c^{-1}$.

Старт-стоп корреляторы донора и акцептора, рассчитанные с помощью метода, описанного в параграфе 2.3, и представленные на рис.30, совпадают со старт-стоп корреляторами одиночных двухуровневых молекул с различными скоростями возбуждения для разных значений скорости F передачи энергии.

При нарастании скорости F передачи энергии коррелятор $s_D(t)$ уменьшается, а область времен, на которой он отличен от нуля, увеличивается. Эти факты свидетельствуют, что временные интервалы между фотонами флуоресценции донора увеличиваются, т.е. интенсивность донорной флуоресценции ослабевает. Изменения в корреляторе $s_A(t)$ противоположны изменениям, происходящим в корреляторе $s_D(t)$.

Населённости уровней 1 и 2 в обоих случаях – флуоресценции донора и акцептора – достигают равновесных значений на порядки быстрее, чем населённость уровня 0, т.к. $D \ll k$, $A \ll k$. Это означает, что можно положить

$\dot{W}_1^{D,A} = \dot{W}_2^{D,A} = 0$. С учётом этого предположения решения систем (5.3) и (5.4) выглядят следующим образом (для лапласовских образов старт-стоп корреляторов донорной и акцепторной флуоресценции):

$$\begin{aligned} s^D(\lambda) &= \frac{kD / (D + F)}{kD / (D + F) - \lambda}; \\ s^A(\lambda) &= \frac{kF / (D + F)}{kF / (D + F) - \lambda}. \end{aligned} \quad (5.5)$$

Подстановка выражений (5.5) в формулу (2.14) даёт распределения числа фотонов, совпадающие с пуассоновскими:

$$w_N^D(t) = \frac{(k_D t)^N}{N!} e^{-k_D t}, \quad w_N^A(t) = \frac{(k_A t)^N}{N!} e^{-k_A t},$$

где величины k_D и k_A определяются как

$$k_D = \frac{kD}{D + F} \quad \text{и} \quad k_A = \frac{kF}{D + F}.$$

Их можно трактовать, как эффективную накачку, соответственно, донора и акцептора. Таким образом, зависимость распределений $w_N^{D,A}(t)$ фотонов донора и акцептора от скорости F передачи энергии в данном случае выражается только в изменении средних чисел фотонов на определённом интервале, форма же распределения сохраняется пуассоновской для любых величин F . Это демонстрирует рис.31.

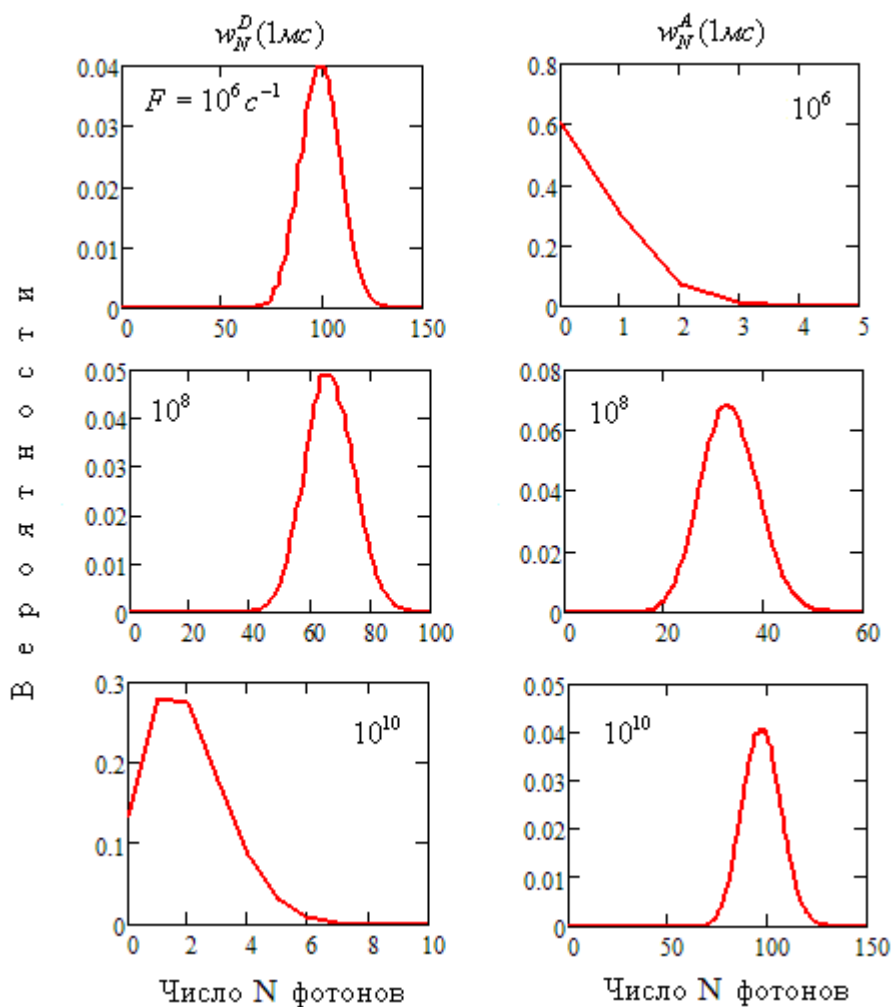


Рис.31. Распределения $w_N^{D,A}(t)$ чисел фотонов донорной и акцепторной флуоресценции в случае двухуровневого донора и двухуровневого акцептора. Скорости процессов в системе определены в (5.1)

При возрастании скорости F передачи энергии максимум распределения $w_N^D(T)$ смещается в сторону малых N , а максимум распределения $w_N^A(T)$ наоборот, в сторону больших N , т.е. происходит увеличение интенсивности флуоресценции акцептора и подавление флуоресценции донора. Интенсивности донорной флуоресценции I_D и акцепторной флуоресценции I_A связаны простой формулой $I_A = FT_D I_D$. При больших скоростях F происходит полная передача энергии от донора к акцептору. Этот факт является важным, так как в других типах пар, с другой конфигурацией

энергетических уровней, этого может не происходить (см. параграфы 5.3, 5.4, 5.5).

При малых скоростях F эффективная накачка донора k_D стремится к значению k , т.е. на донорную флуоресценцию почти не оказывает влияния акцептор. При больших скоростях F эффективная накачка акцептора k_A стремится к значению k . При любых значениях F среднее число суммарных фотонов, испущенных вместе донором и акцептором на интервале времени t , постоянно и равно kt .

Чтобы убедиться в правильности этих распределений, рассчитанных аналитически, был проведён также компьютерный эксперимент. Переходы между уровнями системы моделировались по методу Монте-Карло.

Если бимолекулярная система находится в основном состоянии 0 (DA, см. рис.1), то она перейдёт в состояние 1 (D^*A) через среднее время $1/k$, где k – скорость накачки. При этом разброс временных интервалов t , через которые молекула осуществит переход $0 \rightarrow 1$, определяется уравнением

$$rnd(1) = 1 - \exp(-kt), \quad (5.6)$$

где функция $rnd(1)$ определяет случайным образом число между 0 и 1 с постоянной плотностью вероятности. В состоянии 1 с возбуждённым донором и акцептором в основном состоянии система будет находиться среднее время $1/(D+F)$, а разброс временных интервалов будет описываться уравнением

$$rnd(1) = 1 - \exp(-(D+F)t). \quad (5.7)$$

При этом система или перейдёт в состояние 2 (DA^*), т.е. произойдёт передача энергии от донора к акцептору с вероятностью $F/(D+F)$, или вернётся в основное состояние 0 (DA) с вероятностью $D/(D+F)$. Наконец, из состояния 2 (DA^*) система вернётся в основное состояние 0 (DA) через среднее время $1/A$, при этом интервалы времени, через которые это произойдёт, могут быть найдены с помощью уравнения

$$rnd(1) = 1 - \exp(-At). \quad (5.8)$$

Опираясь на эти рассуждения, с помощью метода Монте-Карло были получены случайные методы испускания фотона флуоресценции донором и акцептором. Результат приведён на рис.32.

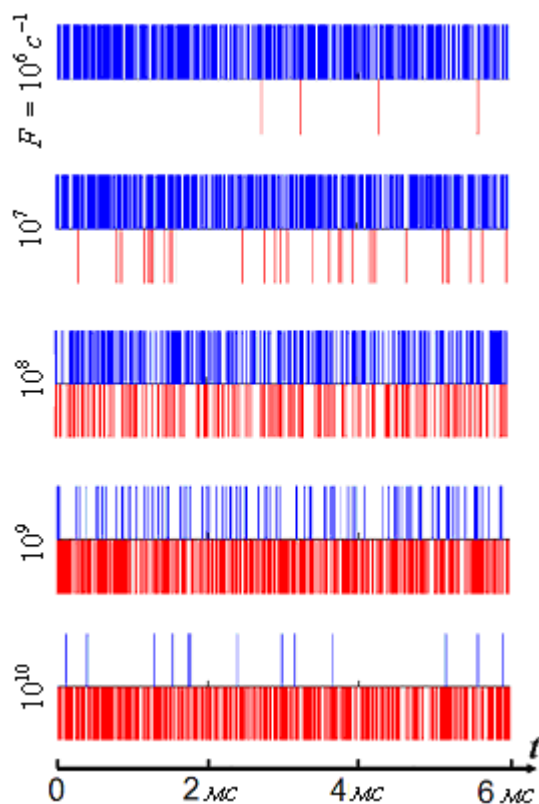


Рис.32. Случайные моменты испускания фотонов двухуровневым донором (верхние синие отрезки) и двухуровневым акцептором (нижние красные отрезки) при различных значениях скорости F передачи энергии, полученные с помощью метода Монте-Карло. Параметры системы заданы выражением (5.1).

Данные рис.32, смоделированные с помощью метода Монте-Карло, находятся в соответствии с особенностями старт-стоп корреляторов и распределений числа фотонов, обсуждавшимися выше. Распределения числа фотонов донора и акцептора, полученные с помощью обработки данных «компьютерного эксперимента», полностью совпадают с распределениями на рис.31, рассчитанными аналитически. Это совпадение позволило отказаться от аналитического расчёта распределений в более сложных случаях, и

перейти к расчёту распределений только с помощью метода Монте-Карло в параграфах 5.2-5.4, где рассматриваются более сложные случаи.

5.2. Влияние триплетного уровня донора на флуоресценцию двухуровневого акцептора (3Д-2А пара)

В данном параграфе будет рассмотрен случай, когда у донора есть триплетный уровень между основным и первым возбуждённым синглетным, т.е. донор является трёхуровневой молекулой. Акцептор по-прежнему является двухуровневым.

Будет показано, что при определённых значениях скорости F передачи энергии трёхуровневый донор может вести себя как двухуровневая молекула, т.е. демонстрировать непрерывную, а не мерцающую флуоресценцию. При другом диапазоне значений скорости F , наоборот, двухуровневый акцептор должен вести себя как трёхуровневая молекула, т.е. демонстрировать мерцающую флуоресценцию.

Схема пары «3Д-2А» представлена на рис.33.

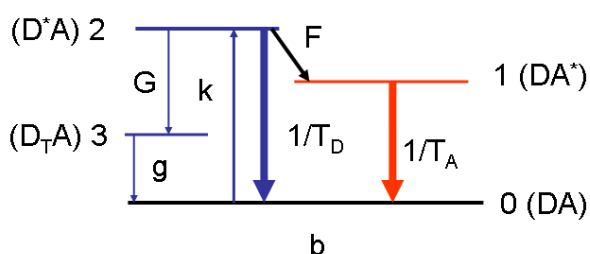


Рис.33. Трёхуровневый донор и двухуровневый акцептор. D, A – донор и акцептор в основном состоянии, D*, A* – в возбуждённом состоянии, D_T – донор в триплетном состоянии.

Здесь константы k , D , A , F имеют тот же физический смысл, что в и параграфе 5.1 (см. пояснения к рис.26), а G и g обозначают скорости попадания донора в триплетное состояние и выхода из него.

Следующие балансные уравнения определяют динамику такой системы:

$$\begin{aligned}
\dot{\rho}_0 &= -k\rho_0 + \rho_1/T_A + \rho_2/T_D + g\rho_3, \\
\dot{\rho}_1 &= -\rho_1/T_A + F\rho_2, \\
\dot{\rho}_2 &= k\rho_0 - (F + G + 1/T_D)\rho_2, \\
\dot{\rho}_3 &= G\rho_2 - g\rho_3.
\end{aligned}
\tag{5.9}$$

Последовательности фотонов донорной и акцепторной флуоресценции, полученные с помощью этих балансных уравнений и метода Монте-Карло (аналогично моделированию для случая пары «2Д-2А», описанному в параграфе 5.1) представлены на рис.34. Они рассчитывались для следующих значений скоростей переходов:

$$k = 10^6 c^{-1}, A = 10^8 c^{-1}, D = 2 \cdot 10^8 c^{-1}, G = 10^6 c^{-1}, g = 10^3 c^{-1}. \tag{5.10}$$

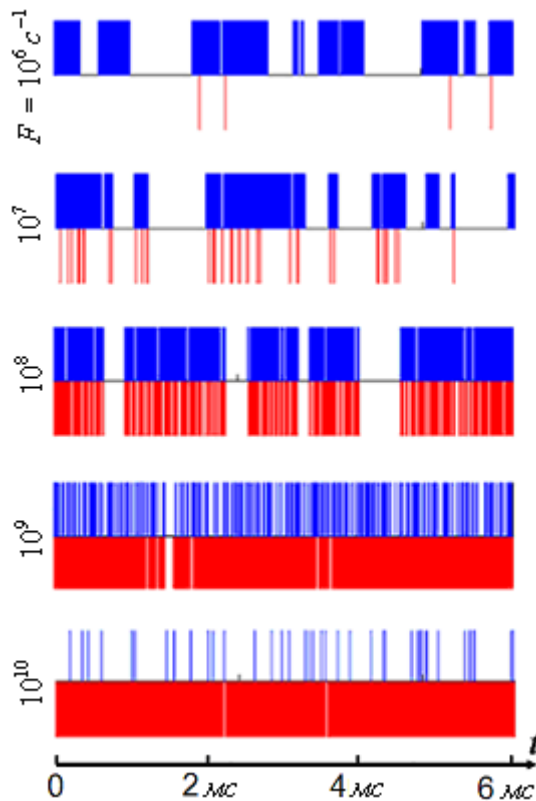


Рис.34. Случайные моменты испускания фотонов трёхуровневым донором (верхние синие отрезки) и двухуровневым акцептором (нижние красные отрезки) при различных значениях скорости F передачи энергии, полученные с помощью метода Монте-Карло. Параметры системы заданы уравнением (5.10)

При малой скорости передачи энергии флуоресценция акцептора слаба, а донор имеет интенсивную мерцающую флуоресценцию, прерываемую off-интервалами. Это показывает верхняя панель рис.34. По мере увеличения

скорости F передачи энергии интенсивность флуоресценции акцептора растёт, и при $FT_D=1$ она фактически сравнивается с интенсивностью флуоресценции донора. Это показывает третья сверху панель. При этом флуоресценция двухуровневого акцептора тоже становится мерцающей. И, наконец, при $FT_D=10^2$ как слабая флуоресценция донора, так и интенсивная флуоресценция акцептора становятся пуассоновской, как у двухуровневой молекулы. Качественное объяснение таких закономерностей будет приведено ниже.

Последовательности фотонов донорной и акцепторной флуоресценции, представленные на рис.34, позволяют «измерить» старт-стоп корреляторы $s_D(t)$ и $s_A(t)$, а системы уравнений

$$\begin{aligned}
 \dot{W}_0^D &= -kW_0^D + W_1^D / T_A + gW_3^D, \\
 \dot{W}_1^D &= -W_1^D / T_A + FW_2^D, \\
 \dot{W}_2^D &= kW_0^D - (F + G + 1/T_D)W_2^D, \\
 \dot{W}_3^D &= GW_2^D - gW_3^D,
 \end{aligned} \tag{5.11}$$

и

$$\begin{aligned}
 \dot{W}_0^A &= -kW_0^A + W_2^A / T_D + gW_3^A, \\
 \dot{W}_1^A &= -W_1^A / T_A + FW_2^A, \\
 \dot{W}_2^A &= kW_0^A - (F + G + 1/T_D)W_2^A, \\
 \dot{W}_3^A &= GW_2^A - gW_3^A,
 \end{aligned} \tag{5.12}$$

для открытой системы, получаемые из системы (5.9) стандартным способом отбрасывания членов, отвечающих за наблюдаемые переходы, позволяют рассчитать $s_D(t)$ и $s_A(t)$. Суммируя левые части уравнений (5.11) и (5.12), приходим к следующим выражениям для коррелятора старт-стоп $s^D(t)$ донорной и $s^A(t)$ акцепторной флуоресценции:

$$s^D(t) = W_2^D(t)/T_D, \quad s^A(t) = W_1^A(t)/T_A \tag{5.13}$$

Эти корреляторы находятся с помощью систем уравнений (5.11) и (5.12) при начальном условии $W_0^{D,A}(0)=1$, означающим испускание фотона донором или

акцептором в нулевой момент времени. Старт-стоп коррелятор донорной флуоресценции представлен на рис.35.

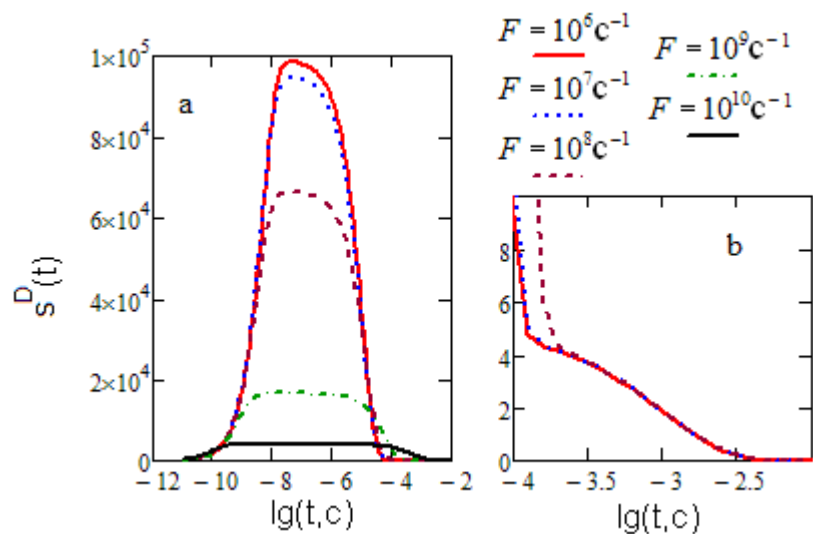


Рис.35. Старт-стоп коррелятор флуоресценции трёхуровневого донора, рассчитанный при различной скорости F передачи энергии и при величине констант (5.10). Старт-стоп коррелятор $s_D(t)$ при $F = 10^{10} c^{-1}$ увеличен в два раза.

В отличие от старт-стоп коррелятора флуоресценции двухуровневой молекулы, коррелятор трёхуровневой молекулы состоит из главной части, показанной на Рис.35а и хвоста («long-term tail»), простирающегося в область больших времён, показанного на Рис.35b (см. параграф 2.2.Б1). Основная часть коррелятора, представленная на Рис.35а, демонстрирует уменьшение интенсивности донорной флуоресценции при увеличении скорости F передачи энергии. При малой скорости передачи энергии, т.е. при $FT_D \leq 1$, донорная флуоресценция является мерцающей. О наличии off-интервалов свидетельствует хвост старт-стоп коррелятора, представленный на Рис.35b. Этот хвост исчезает при $FT_D > 1$, т.е. старт-стоп коррелятор слабой донорной флуоресценции становится таким же, как для непрерывной флуоресценции двухуровневой молекулы.

Совсем иную зависимость от скорости F передачи энергии демонстрирует старт-стоп коррелятор акцепторной флуоресценции, который представлен на Рис.36.

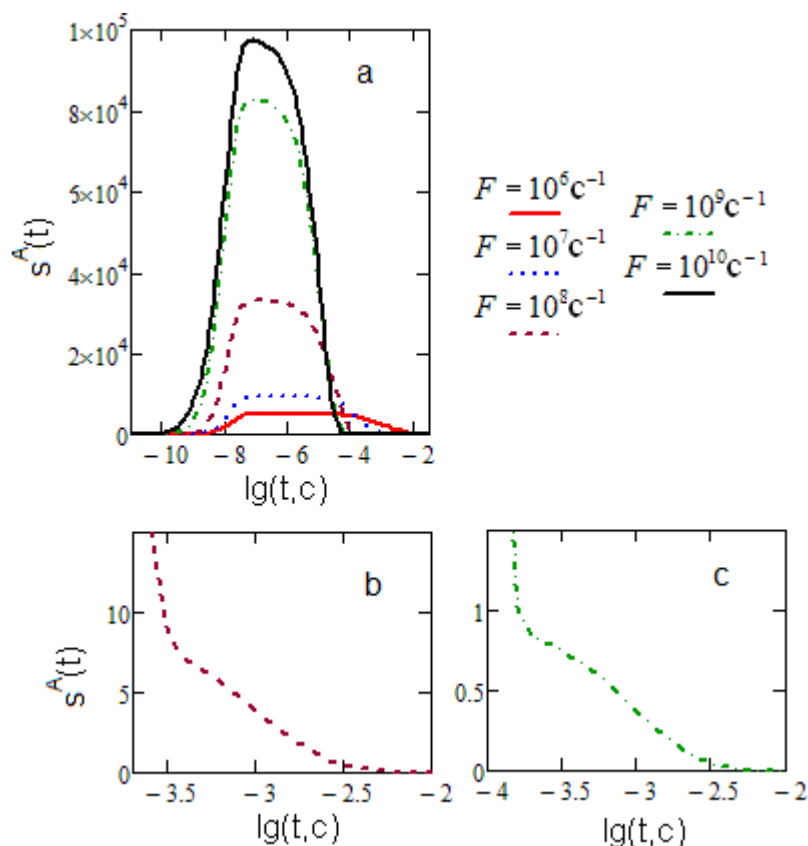


Рис.36. Старт-стоп коррелятор флуоресценции двухуровневого акцептора, рассчитанный при различной скорости F передачи энергии и при величине констант (5.10). Старт-стоп коррелятор $s^A(t)$ при $F = 10^6 c^{-1}$ увеличен в десять раз, при $F = 10^7 s^{-1}$ - в два раза.

Коррелятор, представленный на Рис.36а, демонстрирует увеличение интенсивности акцепторной флуоресценции. При $FT_D \leq 1$ старт-стоп коррелятор такой же, как у двухуровневой молекулы с непрерывной флуоресценцией. Однако при $FT_D > 1$ у старт-стоп коррелятора появляется хвост, который хорошо виден на Рис.36б и Рис.36с. Следовательно, при большой скорости передачи энергии флуоресценция двухуровневого акцептора становится мерцающей. Эти заключения, выводимые из вида старт-стоп корреляторов, подтверждают и функции распределения фотонов донорной и акцепторной флуоресценции. С одной стороны, эти функции

были рассчитаны с помощью формулы (2.14) из старт-стоп корреляторов, представленных на Рис.35 и Рис.36. С другой стороны, они были получены с помощью обработки данных, представленных на рис.34, смоделированных по методу Монте-Карло. Распределения, рассчитанные двумя способами, совпали. Эти функции распределения фотонов на временном интервале $t = 1ms$ показаны на Рис.37. Они подтверждают анализ, проведённый при обсуждении Рис.34.

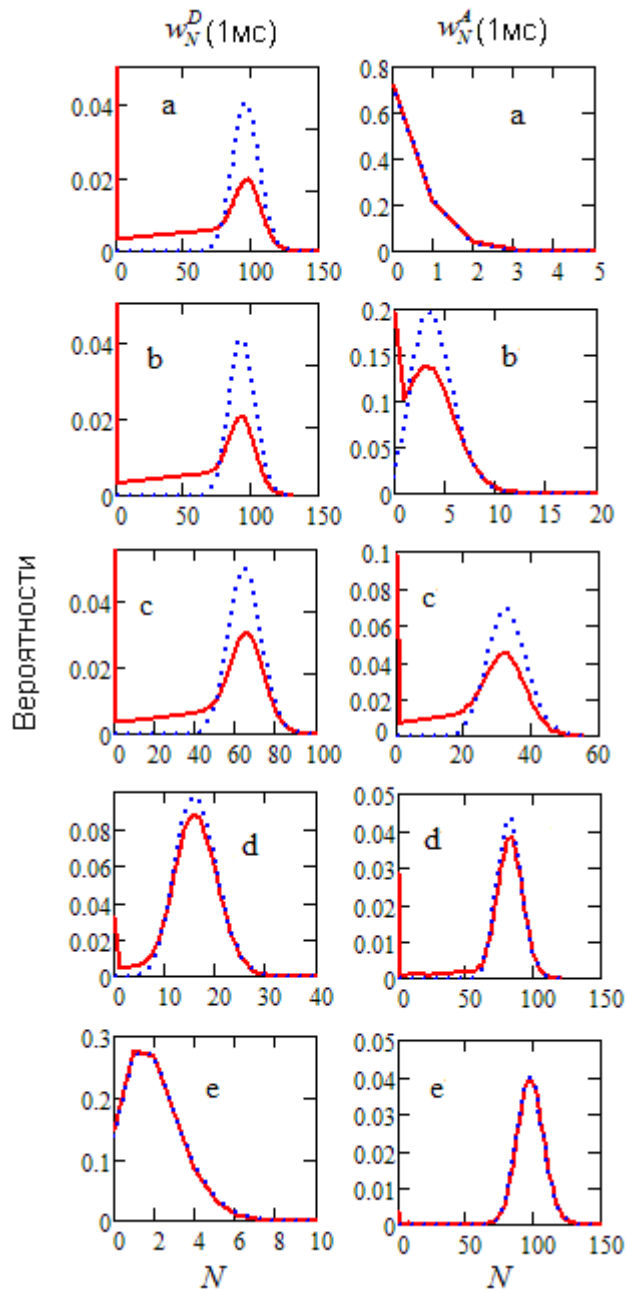


Рис.37. Распределения фотонов во флуоресценции трёхуровневого донора и двухуровневого акцептора на временном интервале 1 мс при различной скорости F передачи энергии и при величине констант (5.10). Пунктирная

кривая – распределение Пуассона. а) $F = 10^6 \text{ c}^{-1}$, $w_0^D(1\text{мс}) = 0.125$ б) $F = 10^7 \text{ c}^{-1}$,
 $w_0^D(1\text{мс}) = 0.121$ в) $F = 10^8 \text{ c}^{-1}$, $w_0^D(1\text{мс}) = 0.095$, $w_0^A(1\text{мс}) = 0.098$ д) $F = 10^9 \text{ c}^{-1}$ е)
 $F = 10^{10} \text{ c}^{-1}$.

Согласно Рис.37, при малой скорости передачи энергии интенсивная флуоресценция донора является мерцающей, о чём свидетельствует плечо в функции распределения фотонов, простирающееся в область малых N . При этом слабая флуоресценция акцептора является непрерывной, о чём свидетельствует пуассоновский характер распределения фотонов. Этот факт отражают функции распределения фотонов $w_N^D(T)$ и $w_N^A(T)$, представленные в самой верхней панели Рис.37.

По мере роста скорости F передачи энергии происходит не только перекачка интенсивности донорной флуоресценции в интенсивность флуоресценции акцептора, но и трансформация вида функций распределения фотонов как донорной, так и акцепторной флуоресценции. Например, при $FT_D = 1$, судя по наличию плато, простирающегося в сторону малых N , в функции распределения фотонов, обе флуоресценции становятся мерцающими. Это полностью согласуется с третьей сверху панелью на рис.34. Мерцание во флуоресценции двухуровневого акцептора вызывается тем, что молекула донора находится часть времени в триплетном состоянии. В течение этого времени донор не может возбуждаться и, следовательно, передавать энергию электронного возбуждения акцептору. Поэтому во флуоресценции двухуровневого акцептора появляются off-интервалы.

При большой скорости передачи энергии, например, при $FT_D = 100$, обе флуоресценции становятся почти пуассоновскими. Это объясняется тем, что энергия электронного возбуждения будет быстро передаваться двухуровневому акцептору. Молекула донора не будет успевать попадать в триплетное состояние. Поэтому как слабая флуоресценция донора, так и интенсивная флуоресценция акцептора демонстрируют пуассоновские распределения фотонов.

При интенсивной передаче энергии, т.е. при больших скоростях F , происходит полная передача энергии, т.е. интенсивность донорной флуоресценции полностью переходит в интенсивность акцепторной флуоресценции. При этом интенсивность флуоресценции акцептора и интенсивность флуоресценции донора по-прежнему связаны формулой $I_A = FT_D I_D$. Это выполняется для пар типа «2Д-2А», рассмотренных в предыдущем параграфе, и «3Д-2А», рассмотренных в этом. Однако это не выполняется для пар типа «2Д-3А» и «3Д-3А», т.е. таких, где акцептор имеет тёмное состояние. В них эффективность передачи энергии не достигает единицы при любых значениях F . Такие пары будут рассмотрены далее.

5.3. Влияние триплетного уровня акцептора на флуоресценцию 2Д-3А пары

В данном параграфе будет рассмотрена донор-акцепторная пара, акцептор которой имеет тёмное состояние, т.е. является трёхуровневым. Схема такой пары представлена на рис.38.

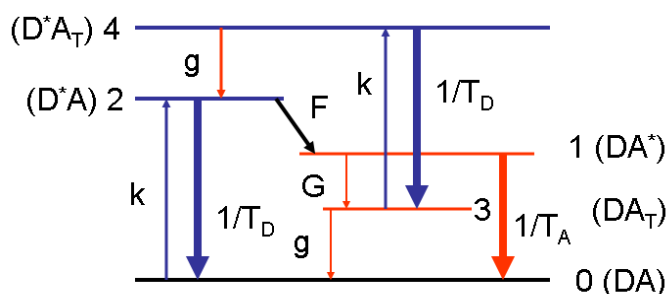


Рис.38. Двухуровневый донор и трёхуровневый акцептор. D, A – донор и акцептор в основном состоянии, D*, A* – в возбуждённом состоянии, A_T – акцептор в триплетном состоянии.

Скорости переходов имеют такое же значение, как и в предыдущем параграфе (см. пояснения к рис.33), однако скорости G попадания в триплет и g выхода из него относятся не к донору, а к акцептору.

Для пары, акцептор которой содержит триплет, характерна не только особая зависимость вида флуктуаций интенсивности от скорости передачи энергии, но и, во-первых, двойная донорная флуоресценция (см. ниже), а во-вторых, отсутствие полной передачи энергии даже при больших значениях скорости F .

Статистика излучения такой системы существенно сложнее, чем статистика систем, рассмотренных в параграфах 5.1 и 5.2. Временная эволюция системы, описываемой схемой, представленной на Рис.38, определяется следующей системой скоростных уравнений:

$$\begin{aligned}
 \dot{\rho}_0 &= -k\rho_0 + \rho_1/T_A + \rho_2/T_D + g\rho_3, \\
 \dot{\rho}_1 &= -(G+1/T_A)\rho_1 + F\rho_2, \\
 \dot{\rho}_2 &= k\rho_0 - (F+1/T_D)\rho_2 + g\rho_4, \\
 \dot{\rho}_3 &= G\rho_1 - (k+g)\rho_3 + \rho_4/T_D, \\
 \dot{\rho}_4 &= k\rho_3 - (g+1/T_D)\rho_4.
 \end{aligned}
 \tag{5.14}$$

В схеме, представленной на рис.38, донорная флуоресценция происходит из двух электронных состояний Д-А пары, а именно: из состояния 2, соответствующего невозбуждённому акцептору, и из состояния 4, соответствующего акцептору, находящемуся в триплетном состоянии. Следовательно, в эксперименте будут детектироваться фотоны донора двух типов. Назовём их 2- и 4-фотоны. В этом случае возможны четыре типа пар последовательно испущенных фотонов: (2,2), (2,4), (4,2) и (4,4). Такие пары можно видеть на рис.38, на котором представлена последовательности фотонов донорной и акцепторной флуоресценции, рассчитанные методом Монте-Карло с использованием системы уравнений (5.14) по методике, описанной в параграфе 5.1. Значения параметров на схеме рис.39 приняты следующими:

$$k = 10^6 c^{-1}, A = 10^8 c^{-1}, D = 2 \cdot 10^8 c^{-1}, G = 5 \cdot 10^5 c^{-1}, g = 500 c^{-1}.
 \tag{5.15}$$

Вместо одного старт-стоп коррелятора флуоресценция донора будет характеризоваться четырьмя старт-стоп корреляторами $s_{\alpha\beta}^D(t)$, составляющими матрицу

$$\hat{s}^D(t) = \begin{pmatrix} s_{22}^D(t) & s_{24}^D(t) \\ s_{42}^D(t) & s_{44}^D(t) \end{pmatrix}. \quad (5.16)$$

Наличие четырёх типов старт-стоп корреляторов особенно хорошо видно на нижней панели Рис.38. На этой панели чётко видна слабая флуоресценция донора, состоящая из 2-фотонов, и интенсивная флуоресценция донора, состоящая из 4-фотонов.

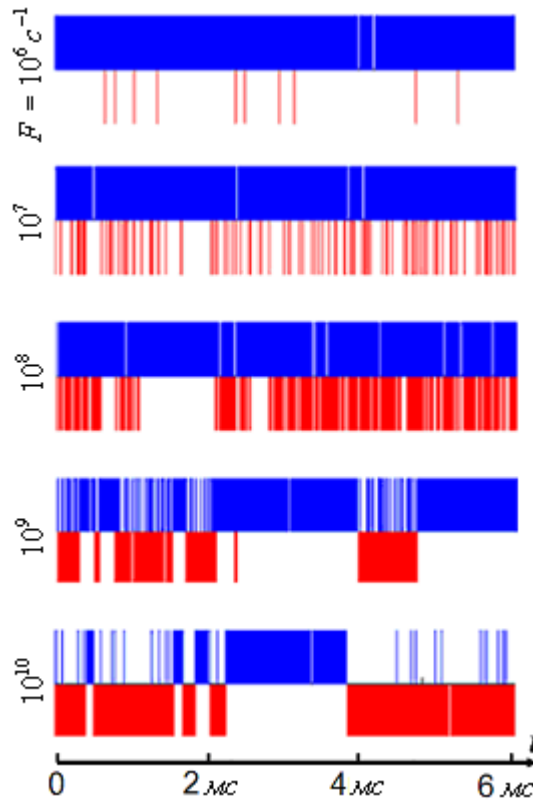


Рис.39. Последовательность фотонов флуоресценции 2х-уровневого донора (сегменты вверх) и 3х-уровневого акцептора (сегменты вниз) при разной скорости F передачи энергии и значениях скоростей переходов, заданных выражением (5.15)

Согласно Рис.39, при малой скорости F передачи энергии как интенсивная флуоресценция донора, так и слабая флуоресценция акцептора являются непрерывными. При возрастании F интенсивность флуоресценции акцептора возрастает, и она становится мерцающей, а при $F \geq 10^9 \text{ s}^{-1}$ флуоресценция донора становится дуальной: фотоны, испускаемые через большие промежутки времени, чередуются с фотонами, испускаемыми через малые

промежутки времени. Эта ситуация чётко видна на четвёртой и пятой панели Рис.39.

Физическая система с дуальной флуоресценцией, в которой старт-стоп коррелятор описывается матрицей, была недавно рассмотрена Осадько и Федяниным [77]. Далее при рассмотрении дуальной донорной флуоресценции будет использоваться подход, развитый в работе [77].

Система уравнений для нахождения старт-стоп корреляторов донорной флуоресценции 2Д-3А пары имеет следующий вид:

$$\begin{aligned}
 \dot{W}_0^D &= -kW_0^D + W_1^D / T_A + gW_3^D, \\
 \dot{W}_1^D &= -(G + 1/T_A)W_1^D + FW_2^D, \\
 \dot{W}_2^D &= kW_0^D - (F + 1/T_D)W_2^D + gW_4^D, \\
 \dot{W}_3^D &= GW_1^D - (k + g)W_3^D, \\
 \dot{W}_4^D &= kW_3^D - (g + 1/T_D)W_4^D,
 \end{aligned} \tag{5.17}$$

Поскольку в нулевой момент времени может быть испущен как 2-фотон, так и 4-фотон, то систему уравнений надо решать при двух типах начальных условий:

$$W_0^D(0) = 1, \quad W_1^D(0) = W_2^D(0) = W_3^D(0) = W_4^D(0) = 0 \tag{5.18}$$

и

$$W_3^D(0) = 1, \quad W_0^D(0) = W_1^D(0) = W_2^D(0) = W_4^D(0) = 0, \tag{5.19}$$

которые соответствуют испусканию в нулевой момент времени 2- и 4-фотона, соответственно. Следовательно, совершая в (5.17) преобразование Лапласа, придём к двум системам уравнений:

$$\begin{aligned}
 (\lambda - k)\bar{W}_0^D + \bar{W}_1^D / T_A + g\bar{W}_3^D &= -1, \\
 (\lambda - G - 1/T_A)\bar{W}_1^D + F\bar{W}_2^D &= 0, \\
 k\bar{W}_0^D + (\lambda - F - 1/T_D)\bar{W}_2^D + g\bar{W}_4^D &= 0, \\
 G\bar{W}_1^D + (\lambda - k - g)\bar{W}_3^D &= 0, \\
 k\bar{W}_3^D + (\lambda - g - 1/T_D)\bar{W}_4^D &= 0,
 \end{aligned} \tag{5.20}$$

и

$$\begin{aligned}
(\lambda - k)\bar{\bar{W}}_0^D + \bar{\bar{W}}_1^D / T_A + g\bar{\bar{W}}_3^D &= 0, \\
(\lambda - G - 1/T_A)\bar{\bar{W}}_1^D + F\bar{\bar{W}}_2^D &= 0, \\
k\bar{\bar{W}}_0^D + (\lambda - F - 1/T_D)\bar{\bar{W}}_2^D + g\bar{\bar{W}}_4^D &= 0, \\
G\bar{\bar{W}}_1^D + (\lambda - k - g)\bar{\bar{W}}_3^D &= -1, \\
k\bar{\bar{W}}_3^D + (\lambda - g - 1/T_D)\bar{\bar{W}}_4^D &= 0,
\end{aligned} \tag{5.21}$$

которые отличаются друг от друга только правой частью. Как было показано в работе [77], четыре коррелятора старт-стоп определяются следующими формулами:

$$s_{22}(\lambda) = \bar{\bar{W}}_2^D / T_D, \quad s_{42}(\lambda) = \bar{\bar{W}}_4^D / T_D, \quad s_{24}(\lambda) = \bar{\bar{W}}_2^D / T_D, \quad s_{44}(\lambda) = \bar{\bar{W}}_4^D / T_D. \tag{5.22}$$

Наряду с дуальной флуоресценцией донора будет регистрироваться одна флуоресценция акцептора, старт-стоп коррелятор которой можно найти, решив следующую систему уравнений:

$$\begin{aligned}
\dot{W}_0^A &= -kW_0^A + W_2^A / T_D + gW_3^A, \\
\dot{W}_1^A &= -(G + 1/T_A)W_1^A + FW_2^A, \\
\dot{W}_2^A &= kW_0^A - (F + 1/T_D)W_2^A + gW_4^A, \\
\dot{W}_3^A &= GW_1^A - (k + g)W_3^A + W_4^A / T_D, \\
\dot{W}_4^A &= kW_3^A - (g + 1/T_D)W_4^A,
\end{aligned} \tag{5.23}$$

с начальным условием

$$W_0^A(0) = 1, \quad W_1^A(0) = W_2^A(0) = W_3^A(0) = W_4^A(0) = 0, \tag{5.24}$$

которое соответствует испусканию фотона акцепторной флуоресценции в нулевой момент времени. Сложение уравнений системы (5.23) приводит к уравнению, определяющему старт-стоп коррелятор флуоресценции акцептора:

$$\dot{W}_2^A + \dot{W}_1^A + \dot{W}_0^A + \dot{W}_3^A + \dot{W}_4^A = -W_1^A / T_A = -s^A(t) \tag{5.25}$$

Решение системы уравнений (5.23) с начальным условием (5.24) приводит к выражению для старт-стоп коррелятора $s_A(t)$ в зависимости от скорости F передачи энергии. Результат приведён на Рис.40.

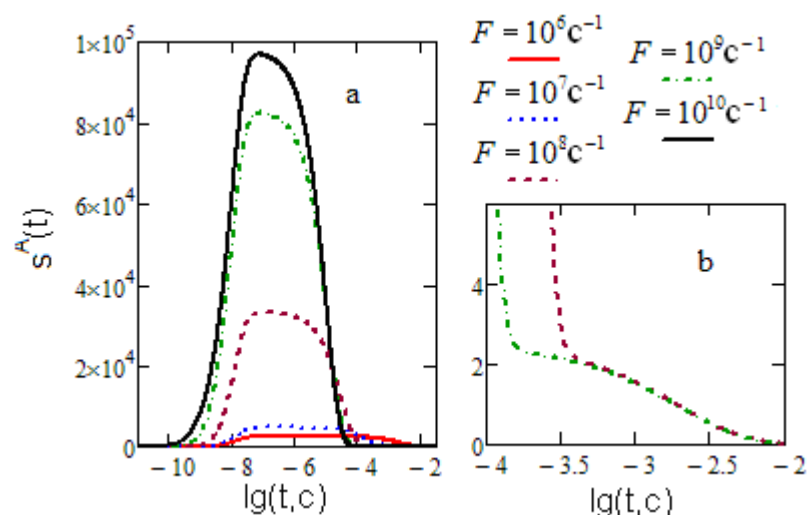


Рис.40. Старт-стоп коррелятор $s_A^A(t)$ флуоресценции трёхуровневого акцептора при различной скорости F передачи энергии от донора и при величине констант (5.15). Старт-стоп коррелятор $s^A(t)$ при $F = 10^6 c^{-1}$ увеличен в пять раз.

Коррелятор $s^A(t)$ имеет главную часть, представленную на Рис.40а, и хвост, простирающийся к большим временам, представленный на Рис.40б. Такой хвост существует в старт-стоп корреляторе мерцающей флуоресценции, испускаемой трёхуровневой молекулой. Он появляется благодаря детектированию фотонов, разделённых большим off-интервалом. Такой хвост в корреляторе $s^A(t)$ появляется только при $FT_D > 10$, т.е. при интенсивной флуоресценции акцептора, когда временные интервалы между фотонами существенно меньше off-интервалов в акцепторной флуоресценции. При малой скорости передачи энергии флуоресценция акцептора слаба, т.е. фотоны флуоресценции акцептора следуют друг за другом с большими интервалами, которые сопоставимы с длительностью off-интервалов, определяемой временем жизни в триплетном состоянии. Строго говоря, нельзя говорить о наличии off-интервалов в такой флуоресценции. В этом случае старт-стоп коррелятор сдвинут в область больших времён, как показывает красная линия на Рис.40а.

Решая системы уравнений (5.20) и (5.21), найдём выражения для четырёх старт-стоп корреляторов донорной флуоресценции, составляющих матрицу:

$$\hat{s}^D(\lambda) = \frac{k/T_D}{(\lambda_0 - \lambda)(\lambda_1 - \lambda)(\lambda_2 - \lambda)(\lambda_3 - \lambda)(\lambda_4 - \lambda)} \times \begin{pmatrix} (1/T_A + G - \lambda)(k + g - \lambda)(1/T_D + g - \lambda) & g(1/T_A + G - \lambda)(1/T_A + G + k - 2\lambda) \\ kFG & (k - \lambda)(1/T_A + G - \lambda)(F + 1/T_D - \lambda) - kF/T_A \end{pmatrix} \quad (5.26)$$

Здесь λ_j - корни уравнения

$$\begin{aligned} &(\lambda - 1/T_D - g)\{(\lambda - k)[(\lambda - 1/T_A - G)(\lambda - 1/T_D - F)(\lambda - k - g) - kFGG] + \\ &(\lambda - k - g(1 + GT_A))kF/T_A\} = 0. \end{aligned} \quad (5.27)$$

Совершая обратное преобразование Лапласа в формуле (5.26), найдём матрицу $\hat{s}_D(t)$, элементы которой при разных значениях скорости F передачи энергии выглядят так, как показано на Рис.41.

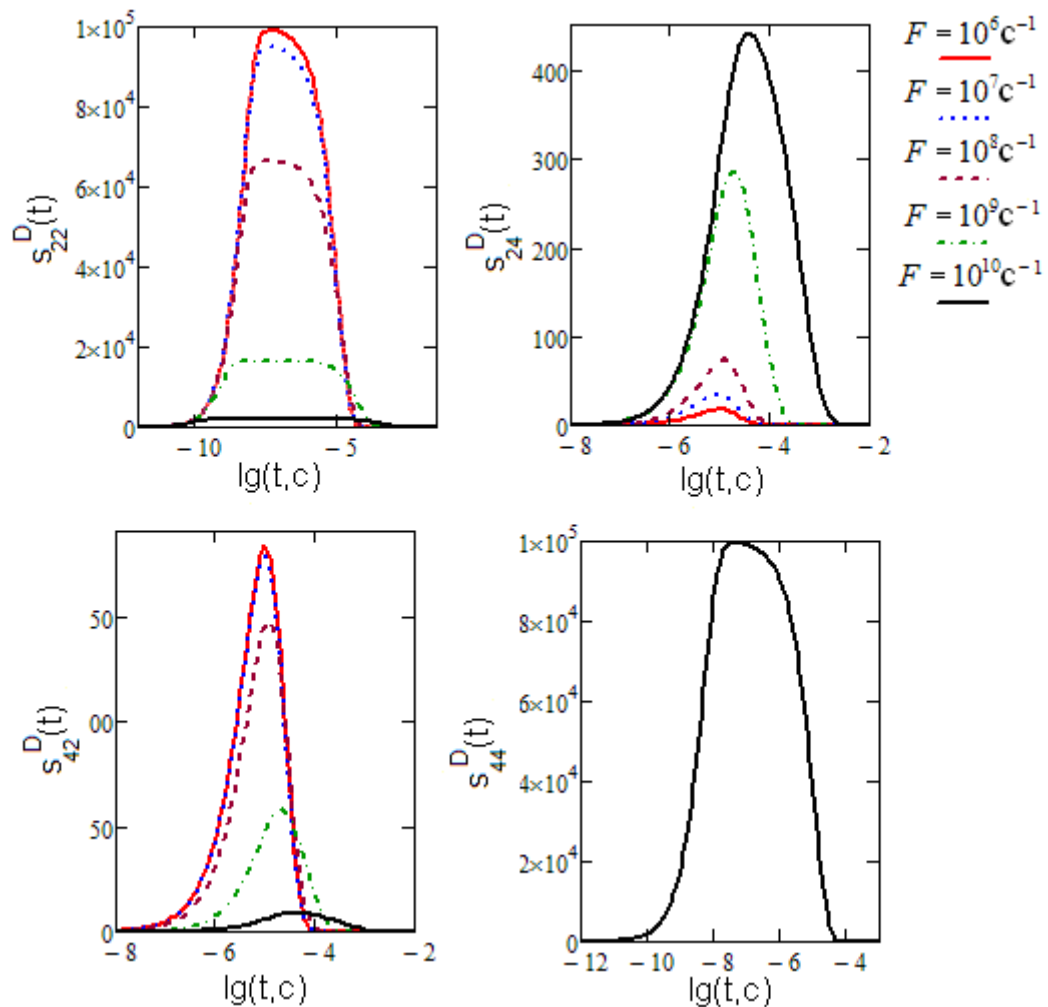


Рис.41. Старт-стоп корреляторы s_{22}^D , s_{24}^D , s_{42}^D и s_{44}^D донорной флуоресценции при разной скорости F передачи энергии, составляющие матрицу (5.16), при

величине констант (5.15). Старт-стоп коррелятор s_{42}^D при $F = 10^7 \text{ c}^{-1}$ увеличен в четыре раза, при $F = 10^6 \text{ c}^{-1}$ - в двадцать раз. Старт-стоп корреляторы s_{44}^D совпадают для всех значений F .

При изменении скорости F передачи энергии изменяются все корреляторы, кроме коррелятора $s_{44}^D(t)$. Этот коррелятор определяет плотность вероятности встретить два смежных 4-фотона донорной флуоресценции, когда молекула акцептора находится в триплетном состоянии. Коррелятор $s_{44}^D(t)$ не зависит от F , поскольку при нахождении донора в триплетном состоянии передача энергии акцептору невозможна. Эту ситуацию отражают синие полосы, хорошо видные, например, на нижней панели Рис.39. Поскольку

$$S_{\alpha\beta}(T) = \int_0^T s_{\alpha\beta}(t) dt \quad (5.28)$$

определяет вероятность наблюдать рождение α -фотона к моменту времени T , если предшествующий фотон β -типа был рождён в нулевой момент времени, то четыре старт-стоп коррелятора, составляющие матрицу (5.16), удовлетворяют следующему условию:

$$\sum_{\alpha} S_{\alpha\beta}(\infty) = 1 \quad (5.29)$$

Согласно этому условию вероятность наблюдать фотон какого-либо типа через бесконечный промежуток времени после рождения предшествующего β -фотона в нулевой момент времени равна единице.

Поскольку 2- и 4-фотоны донорной флуоресценции неразличимы при детектировании, четыре коррелятора, составляющие матрицу $s_{\alpha\beta}^D(t)$, не могут быть измерены по отдельности. В действительности может быть измерен только следующий старт-стоп коррелятор

$$s(t) = \sum_{\alpha,\beta} s_{\alpha\beta}^D n_{\beta} = \langle \bar{1} | \hat{s}^D(t) | \bar{n} \rangle \quad (5.30)$$

где n_{β} - вероятность, что первый фотон пары будет фотоном β -типа. Эта вероятность определяется так:

$$n_2 = \rho_2(\infty) / [\rho_2(\infty) + \rho_4(\infty)], \quad \rho_4(\infty) / [\rho_2(\infty) + \rho_4(\infty)] \quad (5.31)$$

Здесь $\rho_2(\infty)$ и $\rho_4(\infty)$ - решения системы уравнений (5.14) при $\dot{\rho}_j = 0$. Располагая четырьмя типами старт-стоп корреляторов, составляющих матрицу (5.16), можно рассчитать старт-стоп коррелятор $s(t)$. Этот старт-стоп коррелятор представлен на Рис.42. Следует подчеркнуть два обстоятельства. Во-первых, этот коррелятор имеет немонотонную зависимость от F . С ростом F он сначала убывает, а потом возрастает. Во-вторых, в этом корреляторе не видны те детали (а именно, хвост, простирающийся в сторону больших времён), которые позволяли получить информацию о тёмных состояниях молекул по виду старт-стоп коррелятора.

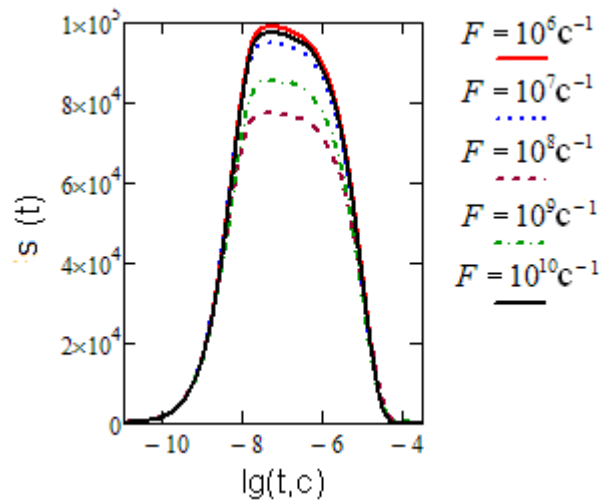


Рис.42. Старт-стоп коррелятор $s(t)$, рассчитанный по формуле (5.30) при различной скорости F передачи энергии при величине констант (5.15).

Поэтому при наличии двойной флуоресценции, чьи фотоны нельзя различить при детектировании, следует использовать функцию распределения фотонов. Формула (2.14) неприменима в данном случае. Следует использовать более сложную формулу

$$w_N(T) = \frac{1}{\tau_0} \int_0^T (T-t) \langle \bar{1} | \{ [\hat{s}(\lambda)^{N-1}]_t - 2[\hat{s}(\lambda)^N]_t + [\hat{s}(\lambda)^{N+1}]_t \} | \bar{n} \rangle dt, \quad (N \geq 1) \quad (5.32)$$

выведенную в работе [63]. Здесь средний интервал τ_0 между фотонами по-прежнему определяется формулой (2.14), в которую, однако, надо подставить коррелятор $s(t)$, определённый формулой (5.30).

Формула (5.32) существенно сложнее формулы (2.14), т.к. содержит произведение матриц. Однако численный расчёт по ней возможен. Он был проведён в статье [77] для случая одиночной молекулы, меняющей конформацию. Однако такой расчёт весьма затруднён. Поэтому в данной диссертационной работе распределения для пары 2Д-3А рассчитывались методом Монте-Карло, т.е. используя последовательности фотонов, представленные на Рис.39. Результат представлен на Рис.43.

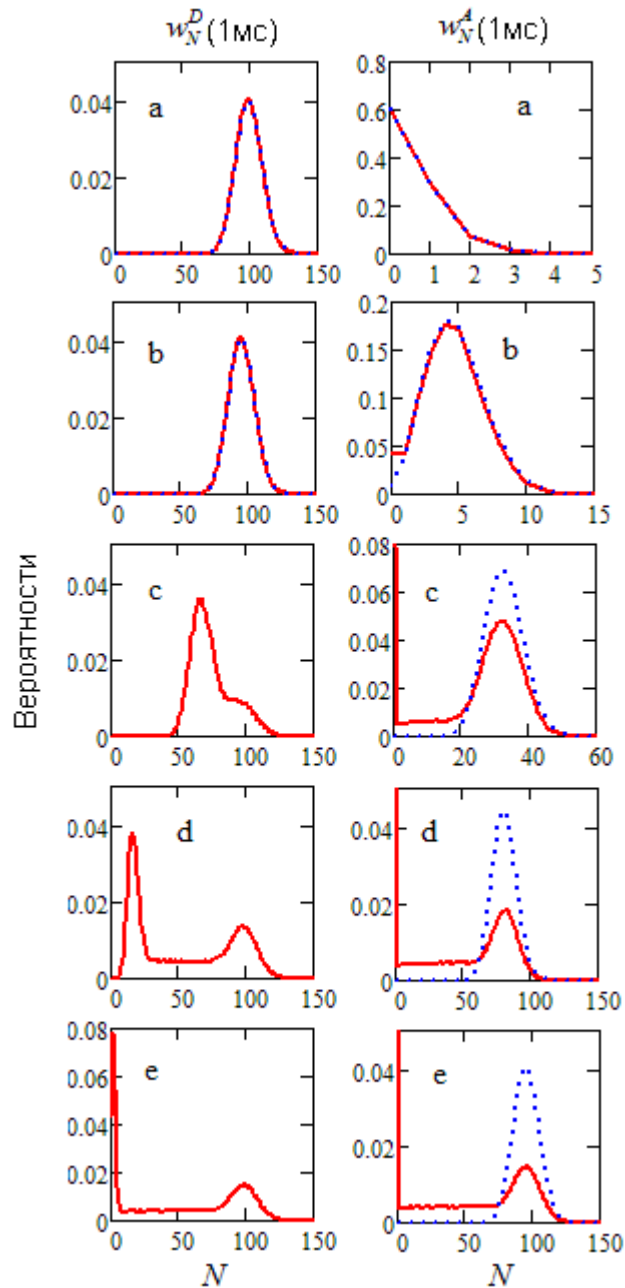


Рис.43. Распределение фотонов на временном интервале 1 мс в двойной флуоресценции двухуровневого донора и во флуоресценции трёхуровневого

акцептора при различной скорости F передачи энергии и при величине констант (5.15). Пунктирная кривая – распределение Пуассона. а) $F = 10^6 c^{-1}$

б) $F = 10^7 c^{-1}$ в) $F = 10^8 c^{-1}$, $w_0^A(1мс) = 0.152$ д) $F = 10^9 c^{-1}$, $w_0^A(1мс) = 0.274$ е)

$F = 10^{10} c^{-1}$, $w_0^A(1мс) = 0.303$

При малой скорости F передачи энергии флуоресценция двухуровневого донора имеет пуассоновское распределение фотонов, что показывает панель а. Однако слабая флуоресценция трёхуровневого акцептора тоже имеет пуассоновское распределение фотонов. Последнее, как уже упоминалось при обсуждении старт-стоп корреляторов, имеет место потому, что длительность оп-интервала при слабой накачке велика. Этот длинный оп-интервал заполнен редкими моментами испускания фотонов. Если время наблюдения T много меньше средней длительности оп-интервала, то такая флуоресценция воспринимается наблюдателем как непрерывная, что и отражает пуассоновский характер распределения фотонов.

При увеличении скорости F передачи энергии (панель б) в функции распределения фотонов флуоресценция трёхуровневого акцептора появляется плечо при малых N , что является признаком мерцающей флуоресценции, а пуассоновское распределение донорной флуоресценции смещается в сторону меньших N .

При дальнейшем увеличении F (панель в) в распределении фотонов двухуровневой донорной молекулы намечается появление двух пиков, которые уже чётко видны на панели д. Появление двух пиков в распределении фотонов донорной флуоресценции объясняется тем, что согласно рис.38, в 2Д-3А парах фотоны донорной флуоресценции могут испускаться как при переходах 2-0, так и 4-3. Переходы 4-3 становятся заметны только при достаточной заселённости триплетного уровня акцептора. Этот уровень может заселяться только при достаточной скорости передачи энергии акцептору. В случае а ($FT_D = 5 \cdot 10^{-3}$) триплет акцептора почти не заселён, и поэтому флуоресценция донора обусловлена только переходами 2-0. Но уже в

случае с ($FT_D = 0.5$) заселение триплетного уровня акцептора достаточно велико, что приводит к появлению заметной флуоресценции с переходами 4-3. Этой флуоресценции отвечает правый пик в функции распределения $w_N^D(T)$ на панели с. Интенсивность же излучения, отвечающего переходам 2-0, падает согласно формуле $k/(1+FT_D)$. Этому излучению отвечает левый пик в функции распределения фотонов донорной флуоресценции. Наличие же широкого плато между двумя пиками свидетельствует, что флуоресценция 2х-уровневого донора становится мерцающей. Это происходит потому, что при $FT_D \gg 1$ переход 2-1 на рис.38, при котором не излучается фотон донорной флуоресценции, оказывается более вероятным, чем переход 2-0 с излучением фотона.

Полная передача энергии в паре 2Д-3А не происходит даже при больших значениях скорости F , так как при попадании акцептора в триплет он становится неспособен принять энергию электронного возбуждения. Поэтому формула $I_A = FT_D I_D$ нарушается, а эффективность передачи энергии в таких донор-акцепторных парах не достигает единицы даже при больших значениях скорости F передачи энергии. Подробнее об этом речь пойдёт в параграфе 5.5.

5.4. Флуктуации флуоресценции трёхуровневого донора и трёхуровневого акцептора (3Д-3А пара)

Случай 3Д-3А пары является комбинацией случаев, описанных в предыдущих параграфах 5.2 и 5.3 (3Д-2А пары и 2Д-3А пары). Поэтому особенности флуктуаций флуоресценции 3Д-3А пары объединяют в себе характерные черты тех обоих случаев.

Схема пары 3Д-3А представлена на рис.44.

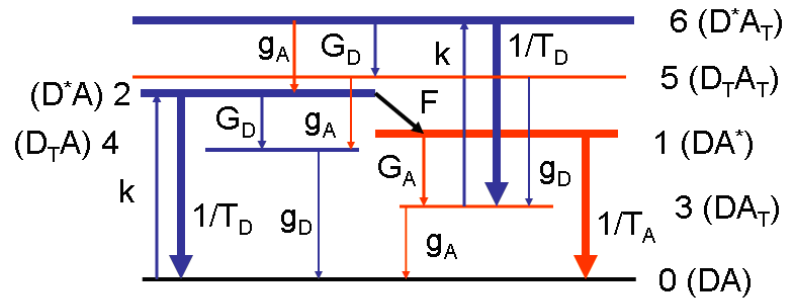


Рис.44. Трёхуровневый донор и трёхуровневый акцептор. D, A – донор и акцептор в основном состоянии, D*, A* – в возбуждённом состоянии, D_T, A_T – в триплетном состоянии.

Здесь k – скорость возбуждения донора, $1/T_D$ и $1/T_A$ – скорости флуоресценции донора и акцептора, G_D , G_A , g_D , g_A – скорости попадания донора и акцептора в триплетное состояние и выхода из него.

Балансные уравнения, соответствующие схеме на рис.44, имеют следующий вид:

$$\begin{aligned}
 \dot{\rho}_0 &= -k\rho_0 + \rho_1/T_A + \rho_2/T_D + g_A\rho_3 + g_D\rho_4, \\
 \dot{\rho}_1 &= -(1/T_A + G_A)\rho_1 + F\rho_2, \\
 \dot{\rho}_2 &= k\rho_0 - (F + 1/T_D + G_D)\rho_2 + g_A\rho_6, \\
 \dot{\rho}_3 &= G_A\rho_1 - (g_A + k)\rho_3 + g_D\rho_5 + \rho_6/T_D, \\
 \dot{\rho}_4 &= G_D\rho_2 - g_D\rho_4 + g_A\rho_5, \\
 \dot{\rho}_5 &= -(g_D + g_A)\rho_5 + G_D\rho_6, \\
 \dot{\rho}_6 &= k\rho_3 - (1/T_D + G_D + g_A)\rho_6.
 \end{aligned}
 \tag{5.33}$$

Используя метод Монте-Карло и эту систему уравнений, можно найти случайные временные моменты испускания фотонов донорной и акцепторной флуоресценции. Результат такого расчёта представлен на Рис.45.

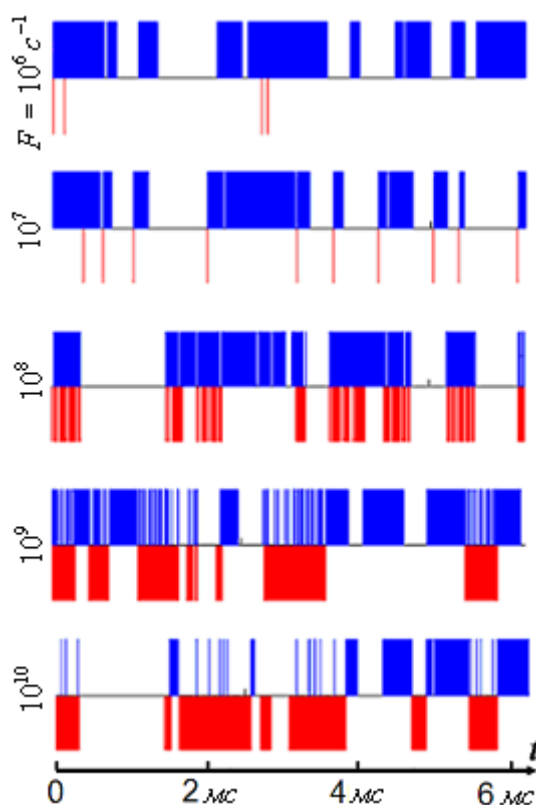


Рис.45. Последовательность фотонов флуоресценции 3х-уровневого донора (сегменты вверх) и 3х-уровневого акцептора (сегменты вниз) при разной величине скорости F передачи энергии.

Для расчётов использовался следующий набор констант:

$$k = 10^5 c^{-1}, \quad 1/T_D = 2 \times 10^8 c^{-1}, \quad 1/T_A = 10^8 c^{-1}, \quad G_D = 10^6 c^{-1}, \quad g_D = 10^3 c^{-1}, \quad G_A = 5 \cdot 10^5 c^{-1},$$

$$g_A = 500 c^{-1} \quad (5.34)$$

Если в каждом из случаев 3Д-2А и 2Д-3А появлялись принципиально новые эффекты, то в случае трёхуровневого донора и трёхуровневого акцептора принципиально новые эффекты не появляются, т.е. качественный характер распределения фотонов можно предсказать, основываясь на Рис.45 и на результатах, описанных в параграфах 5.2 и 5.3 и обсуждённых ранее.

Согласно Рис.43, две жирные синие стрелки, направленные вниз с уровней 2 и 6, показывают, что имеется дуальная донорная флуоресценция, а одна жирная красная стрелка, направленная вниз с уровня 1, показывает, что имеется обычная флуоресценция акцептора. Флуоресценция донора с уровня 6 будет прерываться паузами, когда бимолекулярная система будет попадать

в «тёмное» состояние 5, а флуоресценция донора с уровня 2 будет прерываться паузами, когда бимолекулярная система будет попадать в «тёмное» состояние 4.

Следовательно, в отличие от непрерывной флуоресценции с уровня 4 на рис.37, аналогичная флуоресценция с уровня 6 на Рис.44 будет прерываться off-интервалами. Это хорошо видно, если сравнить верхние панели Рис.39 и Рис.45.

Флуоресценция донора с уровня 2 будет прерываться off-интервалами при малой скорости F передачи энергии, что уже было в аналогичной флуоресценции с уровня 2 на Рис.38. Флуоресценция акцептора с уровня 1, несмотря на наличие у акцептора своего «тёмного» состояния, не будет мерцающей при малой скорости F передачи энергии, потому что временные интервалы между соседними фотонами в слабой акцепторной флуоресценции будут сопоставимы с длительностью $1/g_A$ off-интервалов. Это видно на двух верхних панелях Рис.45.

Однако с ростом скорости передачи энергии интенсивность флуоресценции акцептора будет нарастать, т.е. интервалы между фотонами станут значительно короче длительности $1/g_A$ off-интервалов. Поэтому флуоресценция акцептора станет мерцающей. Это видно на последних трёх панелях Рис.45.

Все описанные выше особенности как донорной, так и акцепторной флуоресценции проявляют себя и в функции распределения фотонов, которая может быть найдена с помощью последовательности событий, изображённой на Рис.45. Результат представлен на Рис.46.

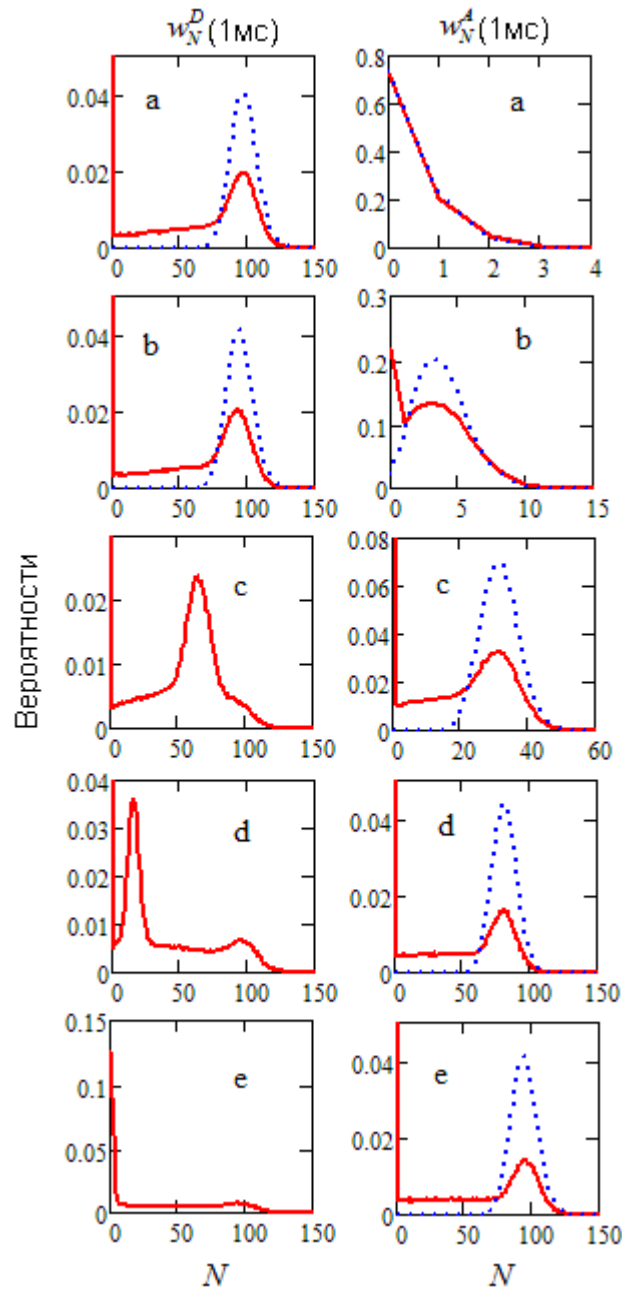


Рис.46. Распределение фотонов на временном интервале 1 мс в двойной флуоресценции трёхуровневого донора и во флуоресценции трёхуровневого акцептора при различной скорости F передачи энергии и при значении констант (5.34). Пунктирная кривая – распределение Пуассона. а) $F = 10^6 c^{-1}$, $w_0^D(1мс) = 0.129$ б) $F = 10^7 c^{-1}$, $w_0^D(1мс) = 0.122$ в) $F = 10^8 c^{-1}$, $w_0^D(1мс) = 0.106$, $w_0^A(1мс) = 0.218$ д) $F = 10^9 c^{-1}$, $w_0^D(1мс) = 0.072$, $w_0^A(1мс) = 0.315$ е) $F = 10^{10} c^{-1}$, $w_0^A(1мс) = 0.337$

Функции $w_N^D(1мс)$ $w_N^A(1мс)$ при всех значениях скорости F передачи энергии имеют плечи, простирающиеся в область малых чисел фотонов N , что свидетельствует о мерцающем характере как донорной, так и акцепторной флуоресценции. Кроме того, в распределении фотонов донорной флуоресценции появляются два пика, что свидетельствует о дуальном характере донорной флуоресценции.

Полной передачи энергии в паре 3Д-3А не наблюдается даже при больших значениях скорости F передачи энергии, аналогично случаю 2Д-3А. Рассмотрим это явление подробнее в следующем параграфе.

5.5. Эффективность передачи энергии в донор-акцепторных парах различного типа

Временные моменты испускания фотонов в флуоресценции донора и акцептора, найденные методом Монте-Карло и изображённые на Рис. 32, 34, 40 и 45, позволяют подсчитать средние интенсивности I_A и I_D флуоресценции акцептора и донора, а также построить график $E(F) = I_A / (I_A + I_D)$ для всех рассмотренных типов донор-акцепторных пар. Эти интенсивности и эффективность передачи энергии представлены на Рис.47. Данные, полученные с помощью обработки моделирования по методу Монте-Карло, представлены на рис.47 квадратами. Однако можно и рассчитать интенсивности и эффективность передачи энергии аналитически. Они пропорциональны населённости уровня, с которого происходит флуоресценция (см. главу 2). В случае дуальной донорной флуоресценции константы

$$I_A = \rho_1(\infty) / T_A, \quad I_D = [\rho_2(\infty) + \rho_4(\infty)] / T_D, \quad (5.35)$$

найденные с помощью системы (5.14), соответствуют интенсивности флуоресценции акцептора и донора для системы 2Д-3А, а константы

$$I_A = \rho_1(\infty) / T_A, \quad I_D = [\rho_2(\infty) + \rho_6(\infty)] / T_D, \quad (5.36)$$

найденные с помощью системы (5.33), соответствуют интенсивности флуоресценции акцептора и донора для системы 3Д-3А.

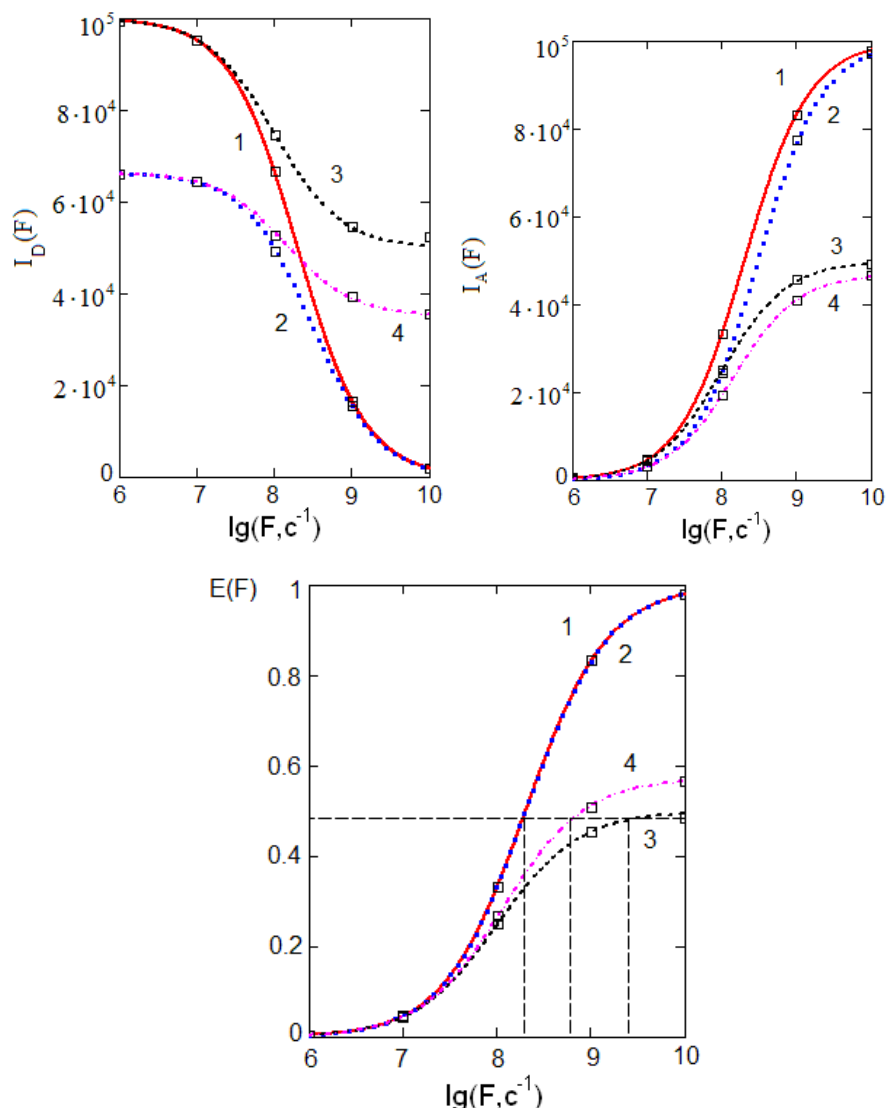


Рис.47. Зависимость интенсивности донорной и акцепторной флуоресценции, а также эффективности передачи энергии от донора акцептору при разной скорости F передачи энергии для 2Д-2А (1), 3Д-2А (2), 2Д-3А (3), 3Д-3А (4).

Интенсивности флуоресценции донора и акцептора описываются следующим набором формул:

Для 2Д-2А пары:

$$I_A = FT_D I_D, \quad (5.37)$$

$$I_D = \frac{k}{1 + kT_D + FT_D(1 + kT_A)} \quad (5.38)$$

Для 3Д-2А пары:

$$I_A = FT_D I_D,$$

$$I_D = \frac{k}{1 + GT_D + kT_D(G/g + 1) + FT_D(1 + kT_A)}. \quad (5.39)$$

Для 2Д-3А пары:

$$I_A = \frac{FT_D}{1 + GT_A + \frac{G}{g} \frac{FT_D kT_A}{(k + g)T_D + 1}} I_D, \quad (5.40)$$

$$I_D = \frac{k \left[1 + \frac{G}{g} \left(\frac{FT_D}{1 + GT_A} \frac{kT_A}{(k + g)T_D + 1} \right) \right]}{1 + kT_D + \frac{FT_D}{1 + GT_A} \left[1 + GT_A \frac{gT_D + 1}{(k + g)T_D + 1} + kT_A \left(\frac{G}{g} + 1 \right) \right]}. \quad (5.41)$$

Для 3Д-3А пары:

$$I_A = \frac{FT_D}{(1 + G_A T_A)(1 + FT_D kT_A Q)} I_D \quad (5.42)$$

$$I_D = \frac{k(1 + FT_D kT_A Q)}{1 + G_D T_D + kT_D \left(1 + \frac{G_D}{g_D} \right) + FT_D \left\{ 1 + kT_A \left[\frac{1}{1 + G_A T_A} + \left(1 + G_D T_D + kT_D \left(1 + \frac{G_D}{g_D} \right) \right) Q \right] \right\}} \quad (5.43)$$

$$Q = \frac{G_A T_A}{(1 + G_A T_A) \left[g_A T_A + (g_A T_A + kT_A)(g_A T_D + G_D T_D) - kT_A G_D T_D \frac{g_D}{g_A + g_D} \right]} \quad (5.44)$$

С помощью формул (5.35) и (5.36) находим следующие выражения для эффективности передачи энергии:

$$E(F) = \frac{\bar{F}(F)T_D}{\bar{F}(F)T_D + 1} \quad (5.45)$$

где

$$\bar{F}(F)T_D = \frac{FT_D}{1 + GT_A + \frac{G}{g} \frac{FT_D kT_A}{(k + g)T_D + 1}} \quad (5.46)$$

для 2Д-3А системы и

$$\bar{F}(F)T_D = \frac{FT_D}{(1 + G_A T_A)(1 + FT_D kT_A Q)} \quad (5.47)$$

для 3Д-3А системы. Константа Q была определена выше формулой (5.44).

Для пар 2Д-2А и 3Д-2А справедлива формула

$$E(F) = \frac{FT_D}{1 + FT_D}. \quad (5.48)$$

На рис.47 наблюдается совпадение результатов аналитических расчётов (сплошные линии) и расчётов с помощью «компьютерного эксперимента» по методу Монте-Карло (квадраты).

Зависимость $I_D(F)$ для всех четырёх типов пар различна. Зависимость $I_A(F)$ для пар 2Д-2А и 3Д-2А близка друг к другу, но она заметно другая для 2Д-3А и 3Д-3А пар. Нижний рисунок показывает, что эффективность передачи энергии в парах 2Д-2А и 3Д-2А одинакова, несмотря на то, что сплошная линия и точки на рисунке для I_D заметно различаются, а на рисунке для I_A почти не различаются. Эта эффективность передачи энергии для систем 2Д-2А и 3Д-2А описывается функцией $FT_D/(1 + FT_D)$. Однако эффективность передачи энергии в Д-А паре может быть описана формулой $FT_D/(1 + FT_D)$ только в случае, когда молекула акцептора не имеет «тёмного» состояния. При наличии у акцептора «тёмного» состояния не происходит полной передачи энергии даже при $FT_D = 100$. Этот эффект обусловлен тем, что акцептор, находящийся в триплетном состоянии, не может принимать энергию от донора. Это хорошо видно на пятой панели Рис.39 и Рис.45.

Эффективность E передачи энергии может заметно отличаться в парах различного типа для одинаковых значений скорости F передачи энергии. Так, значению $E(F)=0.48$ соответствует значение $F=1.85 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$ для 2Д-2А и 3Д-2А пар, $F=2.4 \times 10^9 \text{ с}^{-1}$ для 2Д-3А пары и $F=5.97 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$ для 3Д-3А пары, что показано на рис.47.

5.6. Сравнение теории с экспериментом

Итак, эффективность передачи энергии может описываться простой формулой (5.48) только в случае, если акцептор не имеет тёмных состояний.

Кривые 3 и 4 на рис.47с показывают, что тёмное состояние акцептора подавляет полную передачу энергии, и равенство (5.48) нарушается. В таких случаях его нужно заменить равенством (5.45) с подстановкой в него выражений (5.46) или (5.47).

Однако возникает вопрос: как определить, какую из кривых 1-4 рис.47с использовать для определения значения скорости F по экспериментально измеренному значению эффективности E передачи энергии? Ответ на этот вопрос может быть получен исходя из вида флуктуаций интенсивности флуоресценции.

При сравнении рис. 32, 34, 39 и 45 заметно, что флуктуации различных типов Д-А пар имеют разный вид. Если ни донор, ни акцептор не демонстрируют мерцаний флуоресценции, экспериментаторы имеют дело с парой, где нет тёмных состояний (или они не проявляют себя) – с парой 2Д-2А (см. рис.32). В этом случае следует пользоваться стандартной формулой (5.48) для эффективности передачи энергии. Если и донор, и акцептор имеют мерцания, и их off-интервалы совпадают, то исследуемая пара является 3Д-2А типа (см. рис.34). В этом случае опять следует использовать формулу (5.48) для эффективности передачи энергии. В обоих этих случаях кривая зависимости $E(F)$ – кривая 1 рис.47с.

Если флуоресценция донора является дуальной, т.е. состоит из чередующихся интервалов с разной интенсивностью, а off-интервалы присутствуют только во флуоресценции акцептора (см. рис.39), то исследуемая пара является парой 2Д-3А типа. Тогда следует использовать формулы (5.45) и (5.46) для эффективности передачи энергии. Наконец, если дуальная донорная флуоресценция имеет дополнительные off-интервалы (см. рис.45), пара является парой 3Д-3А типа, и необходимо использовать формулы (5.45) и (5.47).

В обзоре литературы по FRET (глава 4) подробно обсуждалась работа [58]. Авторы этой работы наблюдали следующие флуктуации интенсивности флуоресценции донор-акцепторной пары:

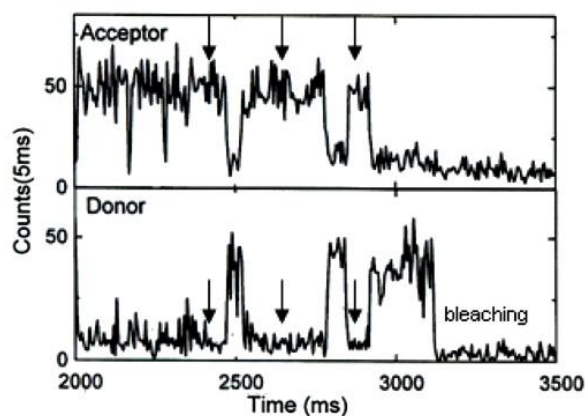


Рис. 48. Флуктуации интенсивности флуоресценции донор-акцепторной пары в работе [58].

На рис.48 видно, что в данном случае донор как донор, так и акцептор демонстрируют мерцающую флуоресценцию, причём off-интервалы донора и акцептора чередуются. Стрелками отмечено, что on-интервалы акцептора совпадают с off-интервалами донора. Как было сказано выше, такой характер свидетельствует о наличии тёмного состояния только у акцептора, т.е. о том, что данная пара является парой 2Д-3А.

Рассмотрим флуктуации Д-А пары, представленные на рис.34, 39 и 45, смоделированные с помощью метода Монте-Карло.



Рис. 49. Флуктуации интенсивности флуоресценции Д-А пар различного типа (см. рис.34, 39, 45).

На рис.49 демонстрируется, что off-интервалы донора и акцептора в паре 3Д-2А совпадают, в паре 2Д-3А – чередуются, а флуоресценция пары 3Д-3А объединяет в себе черты обоих случаев. Так как на рис.48 не наблюдается совпадения off-интервалов молекул, можно сделать вывод, что Вейсс и соавторы имели дело с парой 2Д-3А. Этот вывод находится в согласии с предположением авторов работы [58]: «Acceptor strongly emits due to the near

complete energy transfer from the donor. Blinking events occasionally interrupt its emission. During acceptor's blinking, donor signal is increases because it can not lose energy anymore to the acceptor. When the acceptor resumes its mission, the donor signal is again decreased to its original low level.» («Акцептор интенсивно излучает вследствие почти полной передачи энергии от донора. Мерцания периодически прерывают его излучение. Во время мерцаний акцептора сигнал донора увеличивается, так как он не может отдавать энергию акцептору. Когда акцептор возобновляет излучение, сигнал донора опять падает до первоначального низкого уровня.»)

Сравнивать случайные траектории интенсивности $I(t)$ можно лишь на качественном уровне. Для сравнения с экспериментом, поставленным в работе [58], методом Монте-Карло была смоделирована флуоресценция пары 2Д-3А с параметрами

$$1/T_D = 2 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}, 1/T_A = 10^8 \text{ c}^{-1}, k = 10^4 \text{ c}^{-1}, G = 7 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1} g = 15 \text{ c}^{-1}. \quad (5.49)$$

Такие параметры были выбраны для того, чтобы длительности off-интервалов акцептора и интенсивности донорной и акцепторной флуоресценции были близки к значениям соответствующих величин, имеющим место в работе [58]. На рис.50 представлена флуоресценция 2Д-3А пары с параметрами (5.49) при скорости передачи энергии $F = 5 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$, «измеренная» на интервале накопления сигнала (bin time) 5мс.

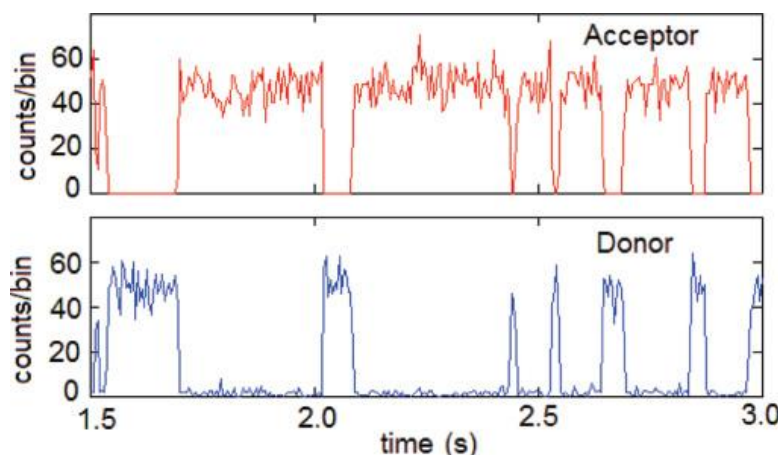


Рис.50. Флуктуации интенсивности флуоресценции 2Д-3А пары с параметрами (5.49) и при $F = 5 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$, смоделированные методом Монте-Карло для сравнения с рис.48 работы [58]. Интервал накопления сигнала 5мс.

Рис.50 качественно проявляет те же черты, что и рис.48 – чередование off-интервалов донора и акцептора. Это подтверждает предположение о 2Д-3А типе пары в работе [58].

Если же обработать траектории 3Д-2А и 3Д-3А, представленные на рис.49, с учётом времени накопления сигнала, то в этих обработанных траекториях будут иметь место совпадения off-интервалов донора и акцептора, что показывает рис.51.

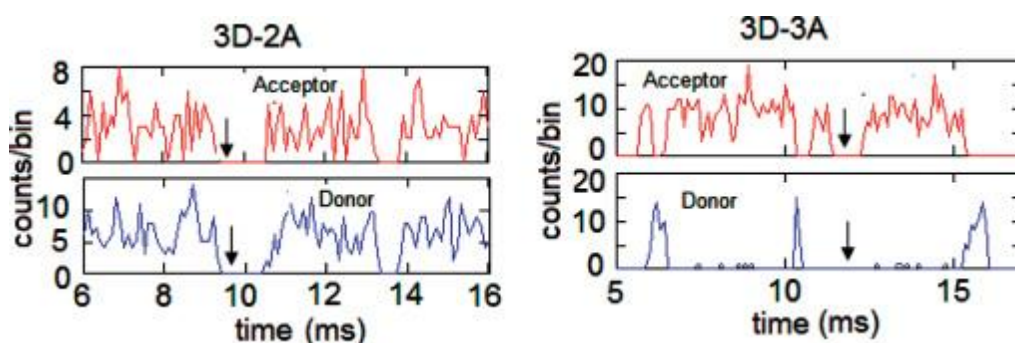


Рис.51. Флуктуации интенсивности флуоресценции 3Д-2А и 3Д-3А пар, представленные на рис.48, обработанные с учётом «времени накопления сигнала» (0.1 мс).

Таким образом, пара, флуоресценция которой была зарегистрирована в работе [58], не может относиться к 3Д-2А или к 3Д-3А типу.

5.7. Основные выводы главы 5

В главе 5 была рассмотрена флуктуирующая флуоресценция различного типа донор-акцепторных пар: 2Д-2А, 3Д-2А, 2Д-3А и 3Д-3А. Трёхуровневые молекулы (3Д, 3А) имеют тёмное нефлуоресцирующее состояние и в отсутствие передачи энергии демонстрируют мерцающую флуоресценцию. Двухуровневые молекулы (2Д, 2А) демонстрируют в отсутствие передачи энергии непрерывную флуоресценцию.

Было показано, что вид флуктуаций интенсивности флуоресценции донора и акцептора зависит от типа пары. Совпадение off-интервалов донора

и акцептора свидетельствует о наличии тёмного состояния у донора, а чередование off-интервалов – у акцептора.

Также было показано, что наличие тёмного состояния у акцептора подавляет полную передачу энергии в донор-акцепторной паре. При активном тёмном состоянии акцептора общепринятая формула $E = \frac{FT_D}{FT_D + 1}$ для эффективности передачи энергии неприменима. Были выведены корректные формулы для эффективности передачи энергии 2Д-3А и 3Д-3А пар.

Результаты теории были проверены, во-первых, с помощью компьютерного моделирования флуктуаций интенсивности флуоресценции по методу Монте-Карло. Результаты численных расчётов по теории и по компьютерному эксперименту совпадают. Во-вторых, с помощью развитой в главе 5 теории был проанализирован эксперимент, проведённый в работе [58]. Основные выводы, полученные в работе [58] и в главе 5, совпадают.

Основные результаты главы 5 также представлены в работах [78, 79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертационной работе проведено теоретическое исследование флуктуаций флуоресценции нескольких одиночных молекул: невзаимодействующих и участвующих в передаче энергии электронного возбуждения. Для невзаимодействующих молекул показано, каким образом квантовый свет одиночной молекулы переходит в классический свет ансамбля молекул при увеличении числа молекул, возбуждаемых пятном лазерного света. Т.е. продемонстрировано, как с ростом числа молекул сглаживаются специфические для одиночной молекулы флуктуации интенсивности флуоресценции (группировка и антигруппировка фотонов). Для донор-акцепторных пар, в которых происходит передача энергии, продемонстрировано, каким образом наличие «тёмных» нефлуоресцирующих состояний (например, триплетных между синглетными) влияет на вид флуктуаций интенсивности флуоресценции обеих молекул, а также на эффективность передачи энергии. Установлено, что наличие «тёмного» состояния в акцепторе препятствует полной передаче энергии от донора.

В диссертационной работе выведены теоретические формулы для: 1) распределения числа фотонов, автокорреляционной функции флуоресценции и других величин для произвольного числа невзаимодействующих молекул, для случаев мерцающей и немерцающей флуоресценции; 2) интенсивностей флуоресценции донора и акцептора и эффективности передачи энергии в донор-акцепторной паре при различных типах донора и акцептора (с «тёмным» состоянием или без него). Что касается второго пункта, продемонстрировано, что разные типы донор-акцепторных пар должны описываться принципиально различными формулами, и показано, как выбрать верную формулу, исходя из вида флуктуаций интенсивности флуоресценции. Достоверность теории, представленной в диссертации, подтверждается совпадением результатов, полученных с помощью неё и независимо от неё с помощью вероятностного метода Монте-Карло.

Основные результаты диссертационной работы могут быть сформулированы следующим образом:

1. Найдено теоретическое выражение для функции распределения $w_N^M(T)$ числа N фотонов флуоресценции за время T накопления сигнала для M невзаимодействующих молекул.
2. Выявлены типичные черты, позволяющие сопоставить графики $w_N^M(T)$ тому или иному типу молекул (двухуровневых или трёхуровневых с триплетным состоянием).
3. Найдено теоретическое выражение для автокорреляционной функции флуоресценции $g^M(T)$ M невзаимодействующих молекул.
4. Исследовано исчезновение квантовых черт флуоресценции (группировка, антигруппировка фотонов) по мере роста M числа молекул в автокорреляционной функции флуоресценции $g^M(T)$ M невзаимодействующих молекул.
5. С помощью метода Монте-Карло смоделированы флуктуации интенсивности флуоресценции донор-акцепторных пар различного типа (двухуровневый или трёхуровневый донор/акцептор). Исследован вид флуктуаций в зависимости от типа пары и скорости F передачи энергии.
6. Вычислены функции распределения $w_N^{D,A}(T)$ числа N фотонов флуоресценции донора и акцептора на времени T накопления сигнала для пар различного типа при различных значениях скорости F передачи энергии.
7. Найдены корректные формулы эффективности $E(F)$ передачи энергии в донор-акцепторной паре в зависимости от типа пары и скоростей всех возможных переходов в системе.
8. Показано, каким образом вид флуктуаций интенсивности флуоресценции донора и акцептора соотносится с конфигурацией энергетических уровней молекул.

9. Проведено сравнение теории с экспериментом, подтверждающее правильность выведенных формул.

В заключении автор диссертации выражает огромную благодарность своему научному руководителю, доктору физ.-мат. наук, профессору Игорю Сергеевичу Осадько за всестороннюю помощь и поддержку при выполнении диссертационного исследования и исключительно внимательное руководство.

Список использованной литературы

1. H. J. Kimble, M. Dagenais, L. Mandel // *Phys. Rev. Lett.*, V. 39, P.691 (1977)
2. M. Dagenais, L. Mandel // *Phys. Rev. A*, V. 18, № 5, P. 2217 (1978)
3. И.С.Осадько «Селективная спектроскопия одиночных молекул» М, Физматлит, 2000, “Selective spectroscopy of single molecules” Springer series in Chemical Physics V69, Berlin, 2003.
4. И.С. Осадько. Флуктуирующая флуоресценция наночастиц. Москва: Физматлит, 2011.
5. W. E. Moerner, M. Orrit // *Science*, V. 283, P. 1670 (1999)
6. Personov R.I. in *Spectroscopy and Excitation Dynamics of Condensed Molecular Systems/* Eds. V.Agranovich, R. Hochstrasser. Amsterdam: North-Holland, 1983
7. A. Szabo // *Phys. Rev. Lett.*, V. 25, P. 294 (1970)
8. S. Weiss // *Science*, V. 283, P. 1676 (1999)
9. W.E. Moerner, L. Kador // *Phys. Rev. Lett.* V. 62, № 21, P. 2535 (1989)
10. W.M. Itano, J.C. Bergquist, D.J. Wineland // *Phys. Rev. A*, V. 38, P. 559 (1988)
11. W.P. Ambrose, Th. Basche, W.E. Moerner // *J. Chem. Phys.*, V. 95, P. 7150 (1991)
12. M. Orrit, J.Bernard // *Phys. Rev. Lett.*, V. 65, P. 2716 (1990)
13. M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt // *J. Chem. Phys.*, V. 112, P. 3117 (2000)
14. K. T. Shimizu, R. G. Neuhauser, C. A. Leatherdale, S. A. Empedocles, W. K. Woo, M. G. Bawendi // *Phys. Rev. B*, V. 63, P. 205316 (2001)
15. M.Kuno, D.P.Fromm, H.F.Hamann, A.Gallagher, D.J.Nesbitt // *J.Chem.Phys.*, V. 115 , P. 1028 (2001)
16. R.Verberk, A.M.van Oijen, M.Orrit // *Phys.Rev. B*, V. 66, P. 233202 (2002)

17. M.Kuno, D.P.Fromm, S.T.Johnson, A.Gallaher, D.J.Nesbitt // *Phys. Rev. B*, V. 67, P. 125304, (2003).
18. А.Г. Витухновский, А.Ю. Переверзев, В.В. Федянин, С.А. Амброзевич, Р.Б. Васильев, Д.Н. Дирин // *Письма в ЖЭТФ*, Т. 96, № 1, С. 18 (2012)
19. А.А. Ващенко, В.С. Лебедев, А.Г. Витухновский, Р.Б. Васильев, И.Г. Саматов // *Письма в ЖЭТФ*, Т. 96, № 2, С. 118 (2012)
20. R.Verberk, M.Orrit // *J.Chem.Phys.* V. 119, P. 2214 (2003)
21. M.Pelton, G.Smith, N.F.Scherer, R.A.Markus // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, V. 104, P. 14249 (2007)
22. G.Margolin, V.Protasenko, M.Kuno, E.Barkai // *J.Phys.Chem. B*, V. 110, P. 19053 (2006)
23. I.S.Osad'ko // *JETP Lett.*, V. 79, P. 416 (2004)
24. I.S.Osad'ko // *Chem.Phys.* V. 316, P. 99 (2005)
25. P.V. Frantsuzov, M.Kuno, B.Janko, R.A.Marcus // *Nat. Phys.*, V. 4, P. 519 (2008)
26. G.M. Svishev. *Selected papers on Confocal Microscopy*. SPIE Press Book, 1996, 309
27. S. Nie, D.T. Chiu, R.N. Zare // *Science*, V. 266, P. 101 (1994)
28. L.Mandel, E.Wolf, *Optical Coherence and Quantum Optics*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995. Русск. Перевод «Оптическая когерентность и квантовая оптика», М., 2000
29. L.Mandel // *Opt.Lett.*, V. 4, P. 205 (1979)
30. I.S.Osad'ko, V.V.Fedyanin // *J.Chem.Phys.*, V. 130, P. 064904 (2009)
31. I.S.Osad'ko // *Mol. Phys.*, V. 107, P. 1879 (2009)
32. H.J.Carmichael, S.Singh, R.Vyas, P.R.Rice // *Phys. Rev. A*, V. 39, P. 1200 (1989)
33. I.A.Gopich, A.Szabo // *J.Chem.Phys.*, V. 124, P. 154712 (2006)
34. C.Cohen-Tannoudji, J.Dalibard // *Europhys. Lett.*, V. 1, P. 441 (1986)
35. И.С.Осадько // *ЖЭТФ*, Т. 113, С. 1606 (1998)
36. И.С.Осадько, А.Л.Щукина // *Опт. и спектр.*, Т. 109, № 5, С. 832 (2010)

37. И.С. Осадько // ЖЭТФ, Т. 128, С. 77 (2005)
38. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina // J. Phys. Chem. C, V. 114, № 23, P. 10349 (2010)
39. I.S. Osad'ko, A.S. Trifonov, I.S. Ezubchenko, I.G. Prokhorova // Surface Science, V. 606, P. 394 (2012)
40. Emerson R., Arnold W. // JGP, V. 16, № 2, P. 191 (1932)
41. Perrin J. // C.R. Acad. Sci., V. 184, P. 1097 (1927)
42. Weigert F., Vehr. d. D. // Phys. Ges., V. 23, P. 100 (1920)
43. Gaviola E., Pringsheim P. // Z. Physik, V. 24, P. 24 (1924)
44. Clegg R., The history of FRET: from conception through the labours of birth. Reviews of fluorescence 2006, 3, под редакцией Geddes C., Lakowicz J. NY, Springer
45. Галанин М.Д., Франк И.М. // ЖЭТФ, Т. 21, № 2, С. 114 (1951)
46. Галанин М.Д. // ЖЭТФ, Т. 21, № 2, С. 126 (1951)
47. Ермолаев В.Л., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б., Шахвердов Т.А., под редакцией Галанина М.Д. «Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения». 1977, Ленинград, Наука
48. Kallmann H., London F. // Z. Physik Chem. B, V. 2, P. 207 (1928)
49. Perrin F. // Ann. Phys., V. 17, P. 283 (1932)
50. Perrin F. // Ann. Institut Poincaré, V. 3, P. 279 (1933)
51. Förster Th. // Naturwissenschaften, V. 33, № 6, P. 166 (1946)
52. Förster Th. // Annalen der Physik, V. 6, P. 2 (1948)
53. Styer L. // Ann. Rev. Biochem., V. 47, P. 819 (1978)
54. Dexter D.L. // J. Chem. Phys., V. 21, P. 836 (1953)
55. Davydov A.S. // Phys. Stat. Sol. V. 30, P. 357 (1968)
56. Dexter D.L., Förster Th., Knox R.S. // Phys. Stat. Sol., V. 34, , P. K159 (1969)
57. Grecco H.E., Verveer P.J. // ChemPhysChem, V. 12, P. 484 (2011)
58. Т. На, А.У. Ting, J. Liang, А.А. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schultz, Sh. Weiss // Chem. Phys., V. 247, P. 107 (1999)

59. Агранович В.М., Галанин М.Д. «Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах», Москва, Наука, 1978
60. Розман И.М. // Опт. и Спектр., Т. 4, С. 536 (1958)
61. Самсон А.М. // Опт. и Спектр. Т. 13, С. 511 (1962)
62. Свешников Б.Я., Широков В.И. // Опт. и Спектр., Т. 12, С. 576 (1962)
63. Рикенглаз М.М., Розман И.М. // Опт. и Спектр., Т. 36, С. 100 (1974)
64. Михелашвили М.С., Розман И.М., Цукая Г.С. // Опт. и Спектр. Т. 36, С. 352 (1974)
65. Birks J.B., Georghiou S. // J. Phys. B (Proc. Phys. Soc.), V. 1, P. 958 (1968)
66. Birks J.B., Salet M., Leite S.C.P. // J. Phys. B, V. 3, P. 513 (1970)
67. Tomura M., Ishiguro E., Mataga N. // J. Phys. Soc. Japan, V. 25, P. 1439 (1968)
68. Elkana Y., Feitelson J., Katchalski E. // J. Chem. Phys. V. 48, P. 2399 (1968)
69. T. Ha, Th. Enderle, D.F. Ogletree, D.S. Chemla, P R. Selvin, Sh. Weiss // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 93, P. 6264 (1996)
70. I. Gopich, A. Szabo // J. Chem. Phys., V. 122, P. 014707 (2005)
71. I. Gopich, A. Szabo // J. Phys. Chem. B, V. 113, P. 10965 (2009)
72. I. Gopich, D. Nettels, B. Schuler, A. Szabo // J. Chem. Phys., V. 131, P. 095102 (2009)
73. I. Gopich, A. Szabo // J. Phys. Chem. B, V. 114, P. 15221 (2010)
74. H.S. Chung, I.V. Gopich, K. McHale, T. Cellmer, J.M. Louis, W.A. Eaton // J. Phys. Chem A, V. 115, P. 3642 (2011)
75. R. Metivier, F. Kulzer, T. Weil, K. Mullen, Th. Basche // J. Am. Chem. Soc., V. 126, P. 14364 (2004)
76. G. Hinze, M. Haase, F. Nolde, K. Mullen, Th. Basche // J. Phys. Chem. A, V. 109, P. 6725 (2005)
77. I.S. Osad'ko, V.V. Fedyanin // Phys.Rev. A, V. 83, P. 063841 (2011)
78. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina // Chem. Phys. Lett., V. 510, P. 257 (2011)
79. I.S. Osad'ko, A.L. Shchukina // Phys. Rev. E, V. 85, P. 061907 (2012)

Список сокращений

СОМ – спектроскопия одиночных молекул

Д-А – донор-акцепторная [пара]

БФЛ – бесфононная линия

ФК – фононное крыло

АФ – автокорреляционная функция

FRET – Förster Resonance Energy Transfer (Фёрстеровская резонансная передача энергии)

Список рисунков

1. Энергетическая схема электронно-колебательных переходов молекулы: переходы, образующие бесфононные линии (БФЛ) и фононные крылья (ФК) спектров поглощения и флуоресценции.....13
2. Неоднородно уширенный спектр поглощения ансамбля молекул, состоящий из суммы однородных спектров поглощения отдельных молекул.....17
3. Схема конфокального микроскопа. Рассеянный свет, идущий из глубины образца (пунктирные линии), отсекается апертурами.....19
4. Двухуровневая частица, совершающая переходы между основным состоянием 0 и первым возбуждённым 1.....23
5. Последовательность фотонов флуоресценции двухуровневой молекулы на временной оси. На каждом интервале накопления сигнала T излучается разное число фотонов.....24
6. Старт-стоп коррелятор одиночной двухуровневой молекулы.....26
7. Распределение числа N фотонов при $1/T_1 = 10/k$ на временном интервале $t = 10/k$ (сплошная линия) и пуассоновское распределение с тем же максимумом (точки).....29
8. Полный двухфотонный коррелятор одиночной двухуровневой молекулы.....31
9. Энергетическая схема молекулы с триплетным уровнем, имеющей мерцающую флуоресценцию.....33
10. Последовательность фотонов мерцающей флуоресценции трёхуровневой молекулы.....34
11. Старт-стоп коррелятор одиночной трёхуровневой молекулы с параметрами (2.33).....35
12. Распределение числа N фотонов трёхуровневой молекулы с параметрами (2.33) на времени накопления сигнала 10^{-3} с.....36

13. Полный двухфотонный коррелятор одиночной трёхуровневой молекулы с параметрами (2.33).....	39
14. Распределение числа N фотонов для одной, двух, трёх и четырёх одинаковых двухуровневых молекул при $1/T_1 = 10/k$ на временном интервале $T = 10/k$	43
15. Распределение числа N фотонов на времени накопления сигнала 10^{-3} с одной (а), двух (б) и трёх (с) одинаковых трёхуровневых молекул с параметрами (2.33).....	44
16. Квантовая траектория интенсивности флуоресценции двух не взаимодействующих молекул (а) и (б) и суммарной флуоресценции этих двух молекул (с).....	47
17. Распределение длин on- и off-интервалов во флуоресценции молекулы 1 и 2.....	48
18. Распределение длин on- и off-интервалов во флуоресценции двух молекул.....	50
19. Временные моменты испускания фотонов флуоресценции молекулой 1 (короткие линии) и молекулой 2 (длинные линии).....	51
20. АФ флуоресценции одной, двух, четырёх десяти и шестидесяти одинаковых молекул с параметрами (2.33), рассчитанные по формуле (3.26).....	53
21. Корреляционная функция флуоресценции молекулы с параметрами (2.33) (а), молекулы с вдвое большими средними длительностями on- и off-интервалов $\tau_{on}^2 = 9 \times 10^{-3} s$ и $\tau_{off}^2 = 15 \times 10^{-3} s$ (б) и этих двух молекул.....	55
22. АФ флуоресценции одного (а) и двух (б) ионов Hg^+ , измеренные в работе [10]. Точки – экспериментальные данные. Сплошные линии – теоретический расчёт в работе [10].....	56
23. Спектры хлорофилла а и в.....	60
24. Безызлучательная передача энергии от донора (D) к акцептору (A).....	61
25. Перекрывание спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора. 1 – поглощение донора, 2 – флуоресценция донора, 3 – поглощение акцептора,	

4 – флуоресценция акцептора. Заштрихованная область – перекрытие спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора.....	68
26. Простейшая схема донор-акцепторной пары.....	69
27. Триplet-триpletная безызлучательная передача энергии от донора (D) к акцептору (A).....	73
28. Двухцветные изображения донор-акцепторной пары, прикрепленной к ДНК с 10 основаниями, полученные Вейссом и соавторами в работе [69]. Масштаб – линия 1 мкм.....	82
29. Квантовые траектории интенсивности флуоресценции донора и акцептора, измеренные экспериментально (слева) и сглаженные с помощью медианного фильтра (справа). Нижняя панель справа – эффективность передачи энергии, рассчитанная с помощью сглаженных траекторий. Данные работы [58].....	85
30. Старт-стоп корреляторы двухуровневого донора (красная сплошная линия) и двухуровневого акцептора (синяя пунктирная линия) при скоростях процессов (5.1). а) $F = 10^6 c^{-1}$ б) $F = 10^7 c^{-1}$ в) $F = 10^8 c^{-1}$ д) $F = 10^9 c^{-1}$ е) $F = 10^{10} c^{-1}$	97
31. Распределения $w_N^{D,A}(t)$ чисел фотонов донорной и акцепторной флуоресценции в случае двухуровневого донора и двухуровневого акцептора. Скорости процессов в системе определены в (5.1).....	99
32. Случайные моменты испускания фотонов двухуровневым донором (верхние синие отрезки) и двухуровневым акцептором (нижние красные отрезки) при различных значениях скорости F передачи энергии, полученные с помощью метода Монте-Карло. Параметры системы заданы выражением (5.1).....	101
33. Трёхуровневый донор и двухуровневый акцептор. D, A – донор и акцептор в основном состоянии, D*, A* – в возбуждённом состоянии, D _T – донор в триpletном состоянии.....	102
34. Случайные моменты испускания фотонов трёхуровневым донором (верхние синие отрезки) и двухуровневым акцептором (нижние красные	

отрезки) при различных значениях скорости F передачи энергии, полученные с помощью метода Монте-Карло. Параметры системы заданы уравнением (5.10).....	103
35. Старт-стоп коррелятор флуоресценции трёхуровневого донора, рассчитанный при различной скорости F передачи энергии и при величине констант (5.10). Старт-стоп коррелятор $s_D(t)$ при $F = 10^{10} c^{-1}$ увеличен в два раза.....	105
36. Старт-стоп коррелятор флуоресценции двухуровневого акцептора, рассчитанный при различной скорости F передачи энергии и при величине констант (5.10). Старт-стоп коррелятор $s^A(t)$ при $F = 10^6 c^{-1}$ увеличен в десять раз, при $F = 10^7 s^{-1}$ - в два раза.....	106
37. Распределения фотонов во флуоресценции трёхуровневого донора и двухуровневого акцептора на временном интервале 1 мс при различной скорости F передачи энергии и при величине констант (5.10). Пунктирная кривая – распределение Пуассона. а) $F = 10^6 c^{-1}$, $w_0^D(1мс) = 0.125$ б) $F = 10^7 c^{-1}$, $w_0^D(1мс) = 0.121$ в) $F = 10^8 c^{-1}$, $w_0^D(1мс) = 0.095$, $w_0^A(1мс) = 0.098$ д) $F = 10^9 c^{-1}$ е) $F = 10^{10} c^{-1}$	107
38. Двухуровневый донор и трёхуровневый акцептор. D, A – донор и акцептор в основном состоянии, D*, A* – в возбуждённом состоянии, A _T – акцептор в триплетном состоянии.....	109
39. Последовательность фотонов флуоресценции 2х-уровневого донора (сегменты вверх) и 3х-уровневого акцептора (сегменты вниз) при разной скорости F передачи энергии и значениях скоростей переходов, заданных выражением (5.15).....	111
40. Старт-стоп коррелятор $s_A(t)$ флуоресценции трёхх уровневого акцептора при различной скорости F передачи энергии от донора и при величине констант (5.15). Старт-стоп коррелятор $s^A(t)$ при $F = 10^6 c^{-1}$ увеличен в пять раз.....	114

41. Старт-стоп корреляторы s_{22}^D , s_{24}^D , s_{42}^D и s_{44}^D донорной флуоресценции при разной скорости F передачи энергии, составляющие матрицу $s^D(t)$, при величине констант (5.15). Старт-стоп коррелятор s_{42}^D при $F = 10^7 \text{ c}^{-1}$ увеличен в четыре раза, при $F = 10^6 \text{ c}^{-1}$ - в двадцать раз. Старт-стоп корреляторы s_{44}^D совпадают для всех значений F	115
42. Старт-стоп коррелятор $s(t)$, рассчитанный по формуле (5.30) при различной скорости F передачи энергии при величине констант (5.15).....	117
43. Распределение фотонов на временном интервале 1 мс в двойной флуоресценции двухуровневого донора и во флуоресценции трёхуровневого акцептора при различной скорости F передачи энергии и при величине констант(5.15). Пунктирная кривая – распределение Пуассона. а) $F = 10^6 \text{ s}^{-1}$ 85 б) $F = 10^7 \text{ s}^{-1}$ в) $F = 10^8 \text{ s}^{-1}$, $w_0^A(1\text{ms}) = 0.152$ д) $F = 10^9 \text{ s}^{-1}$, $w_0^A(1\text{ms}) = 0.274$ е) $F = 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $w_0^A(1\text{ms}) = 0.303$	118
44. Трёхуровневый донор и трёхуровневый акцептор. D, A – донор и акцептор в основном состоянии, D*, A* – в возбуждённом состоянии, DT, AT – в триплетном состоянии.....	121
45. Последовательность фотонов флуоресценции 3х-уровневого донора (сегменты вверх) и 3х-уровневого акцептора (сегменты вниз) при разной величине скорости передачи энергии.....	122
46. Распределение фотонов на временном интервале 1 мс в двойной флуоресценции трёхуровневого донора и во флуоресценции трёхуровневого акцептора при различной скорости F передачи энергии и при значении констант(5.34). Пунктирная кривая – распределение Пуассона. а) $F = 10^6 \text{ s}^{-1}$, $w_0^D(1\text{ms}) = 0.129$ б) $F = 10^7 \text{ s}^{-1}$, $w_0^D(1\text{ms}) = 0.122$ в) $F = 10^8 \text{ s}^{-1}$, $w_0^D(1\text{ms}) = 0.106$, $w_0^A(1\text{ms}) = 0.218$ д) $F = 10^9 \text{ s}^{-1}$, $w_0^D(1\text{ms}) = 0.072$, $w_0^A(1\text{ms}) = 0.315$ е) $F = 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $w_0^A(1\text{ms}) = 0.337$	125
47. Зависимость интенсивности донорной и акцепторной флуоресценции, а также эффективности передачи энергии от донора акцептору при разной	

скорости передачи энергии для 2Д-2А (1), 3Д-2А (2), 2Д-3А (3), 3Д-3А (4).....	127
48. Флуктуации интенсивности флуоресценции донор-акцепторной пары в работе [58].....	130
49. Флуктуации интенсивности флуоресценции Д-А пар различного типа (см. рис.34, 39, 45).....	131
50. Флуктуации интенсивности флуоресценции 2Д-3А пары с параметрами (5.49) и при $F = 5 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$, смоделированные методом Монте-Карло для сравнения с рис.48 из работы [58]. Интервал накопления сигнала 5 мс.....	132
51. Флуктуации интенсивности флуоресценции 3Д-2А и 3Д-3А пар, представленные на рис.48, обработанные с учётом «времени накопления сигнала» (0.1 мс).....	133

Список формул

1.1.....	20	2.27.....	32	3.5.....	45
		2.28.....	32	3.6.....	45
2.1.....	21	2.29.....	34	3.7.....	45
2.2.....	21	2.30.....	35	3.8.....	45
2.3.....	22	2.31.....	35	3.9.....	46
2.4.....	24	2.32.....	35	3.10.....	48
2.5.....	25	2.33.....	36	3.11.....	49
2.6.....	25	2.34.....	36	3.12.....	49
2.7.....	25	2.35.....	37	3.13.....	49
2.8.....	25	2.36.....	37	3.14.....	49
2.9.....	26	2.37.....	39	3.15.....	49
2.10.....	26	2.38.....	39	3.16.....	50
2.11.....	26	2.39.....	39	3.17.....	51
2.12.....	27	2.40.....	39	3.18.....	51
2.13.....	27	2.41.....	39	3.19.....	52
2.14.....	28	2.42.....	40	3.20.....	52
2.15.....	28	2.43.....	40	3.21.....	52
2.16.....	28	2.44.....	40	3.22.....	52
2.17.....	29	2.45.....	40	3.23.....	52
2.18.....	30	2.46.....	40	3.24.....	52
2.19.....	30	2.47.....	40	3.25.....	53
2.20.....	30	2.48.....	40	3.26.....	53
2.21.....	30	2.49.....	41	3.27.....	54
2.22.....	31			3.28.....	54
2.23.....	32	3.1.....	42	3.29.....	54
2.24.....	32	3.2.....	42	3.30.....	55
2.25.....	32	3.3.....	43		
2.26.....	32	3.4.....	44	4.1.....	63

4.2.....	64	4.30.....	86	5.23.....	113
4.3.....	64	4.31.....	87	5.24.....	113
4.4.....	65	4.32.....	87	5.25.....	113
4.5.....	66	4.33.....	88	5.25.....	115
4.6.....	67	4.34.....	91	5.26.....	115
4.7.....	67			5.27.....	115
4.8.....	67	5.1.....	95	5.28.....	116
4.9.....	68	5.2.....	95	5.29.....	116
4.10.....	69	5.3.....	96	5.30.....	116
4.11.....	69	5.4.....	96	5.31.....	116
4.12.....	69	5.5.....	98	5.32.....	117
4.13.....	70	5.6.....	100	5.33.....	122
4.14.....	71	5.7.....	100	5.34.....	123
4.15.....	71	5.8.....	100	5.35.....	126
4.16.....	72	5.9.....	103	5.36.....	126
4.17.....	72	5.10.....	103	5.37.....	128
4.18.....	73	5.11.....	104	5.38.....	128
4.19.....	74	5.12.....	104	5.39.....	128
4.20.....	74	5.13.....	104	5.40.....	128
4.21.....	75	5.14.....	110	5.41.....	128
4.22.....	75	5.15.....	110	5.42.....	128
4.23.....	76	5.16.....	111	5.43.....	128
4.24.....	77	5.17.....	112	5.44.....	128
4.25.....	78	5.18.....	112	5.45.....	128
4.26.....	78	5.19.....	112	5.46.....	128
4.27.....	79	5.20.....	112	5.47.....	128
4.28.....	79	5.21.....	113	5.48.....	128
4.29.....	80	5.22.....	113	5.49.....	131