

# 近场光显微镜及对鱼鳞片材料的研究\*

韩 涛 高敦堂 都思丹

(南京大学信息物理系, 南京 210093)

**提要** 对 NFOM 的原理进行了论述,并在一个实验的 NFOM 系统上对鱼鳞片样品进行了成像和分析。结果表明 NFOM 系统可对各种透明、半透明样品进行成像,证实了鱼鳞片中骨胶原分子有序排列形成生物驻极体特性的现象,同时观察到了鱼鳞片微米级生物全息现象。

**关键词** 近场光显微镜,生物全息,鱼鳞

## 1 引 言

光学显微镜在应用于活体组织成像、材料研究、半导体光谱分析等科学研究中,面临着对分辨率要求越来越高的问题。由于存在衍射极限,分辨率受半波长的局限。

获得更高分辨率的技术主要有两大类,一是使用了更短的波长,如电子或 X 射线显微镜。但由于对样品有辐射损伤,样品不失真制备不易,对一些生物样品无法观察,应用有很大的限制。第二类方法包括各种形式的扫描探针显微镜,如扫描隧道显微镜(STM)、原子力显微镜(AFM)等。其中近场光显微镜(NFOM)可以直接获得物体表面的光学特性,可以看成传统的光学显微镜和扫描探针技术结合的结晶。这种方法对物体无损伤,可应用于各种非导体材料特别是生物材料的检测、成像,是 80 年代后期发展起来的一种很有前途的光子扫描显微镜。

本文分析了近场光显微镜的原理及其对生物样品观察的特有的优越性,并在一个实用的近场光显微镜的系统上进行了各种材料包括光栅生物材料等的二维成像并做了分析。成功地观察到了  $1\ \mu\text{m}$  的条形正弦位相型光栅。对生物材料鱼鳞片的观察,证实了鱼鳞片中骨胶原分子有序排列形成生物驻极体特性的现象,以及其中的介观材料微粒的存在,并和 AFM 图像进行了比照,得到了一致的结论。同时也观察到了鱼鳞片中微观的有序排列,为分形几何和生物全息特性提供了有力的证据。图像的质量和分辨率达到了较好的水平<sup>[1]</sup>。

## 2 近场光显微镜(NFOM)的原理

要提高 NFOM 分辨率就要提高系统的通频带,不仅要检测因衍射而产生的传播分量,而且还要检测倏逝波分量。前者为低空间频率部分( $< 2/\lambda$ ),后者为高空间频率部分( $> 2/\lambda$ )。

这里采用角度谱的方法说明近场分量的作用。考虑一个空间有限物体,定义  $f(x, y, z)$  为它

\* 国家自然科学基金资助项目。

的透射率(函数)。用二维傅里叶积分表示为

$$F(u, v) = \iint_{-\infty}^{+\infty} f(x, y, 0) \exp[-j2\pi(ux + vy)] dx dy \quad (1)$$

此处  $u, v$  表示物体的空间频率, 因物体有限,  $F(u, v)$  包含了从  $0 \sim 1/\lambda$  的所有频率。

如果用一单位振幅的平面波照明该物体, 在距离  $z$  处, 角度谱记为

$$F(\alpha K/2\pi, \beta K/2\pi, z) = F(\alpha K/2\pi, \beta K/2\pi) \exp(jK\gamma z) \quad (2)$$

其中  $\alpha = \lambda_x, \beta = \lambda_y, \gamma = \sqrt{1 - (\lambda_x)^2 - (\lambda_y)^2}, K = 2\pi/\lambda, \lambda$  为波长。(2) 式表明了平面波发散特性和方向余弦  $\alpha$  和  $\beta$  直接有关, 如果

$$\alpha^2 + \beta^2 < 1 \quad (3)$$

波就是传播的, 从物体传向观察者, 如果

$$\alpha^2 + \beta^2 > 1 \quad (4)$$

波就会在  $z$  方向上迅速衰减, 对这样的倏逝波, 可表示为

$$F(\alpha K/2\pi, \beta K/2\pi, z) = F(\alpha K/2\pi, \beta K/2\pi) \exp[-K(\sqrt{\alpha^2 + \beta^2 - 1}z)] \quad (5)$$

注意, 方向余弦和物体结构有关, 不考虑相互作用, 它们和物体的空间频率成比例

$$u = \alpha K/2\pi, \quad v = \beta K/2\pi \quad (6)$$

这样不等式(3)可写为

$$u + v < (K/2\pi)$$

例如, 物体是一个一维的狭缝( $v = 0$ ), 可以推出传向观察者的最高空间频率为

$$u = K/2\pi = 1/\lambda \quad (7)$$

可检测到的最高空间频率为

$$u' = 2u = K/\pi = 2/\lambda \quad (8)$$

Rayleigh 极限可以直接从(8)式得出。

引进穿透深度  $d$ , 来表明倏逝波的衰减,  $d$ , 为在  $z$  方向上衰减  $1/e$  的距离。如果  $u = 1/50 \text{ nm}^{-1}$ , 对波长为  $500 \text{ nm}$ ,  $d = 8 \text{ nm}$ 。这说明穿透深度与物体的空间频率有关。物体的空间频率越高, 穿透深度就越小。关于这一点, 在实验中也得到了证实。

以上分析指出, 一个有限大物体, 衍射时存在着发散波和倏逝波。在内部反射中, 辐射分量和非辐射分量同时存在的不可分性理论已指出<sup>[2,3]</sup>。既然辐射分量中只存在着物体的低频分量, 要突破 Rayleigh 极限, 就必须探测非辐射场(倏逝场)才能提高光学探测系统的通频带, 也即提高分辨率。

在内全反射(TIR)下, 倏逝场有其特殊性<sup>[4]</sup>。检测带有表面起伏信息的倏逝波就得到样品三维形貌图(见图 1)。NFOM 可分为采集式和照射式。图 1 是采集式的, 这种形式优点在于:(1) 结构简便;(2) 噪声小;(3) 当光透过样品时, 也反应了样品内部的信息。其它类型的 NFOM 可称为外反射式 NFOM, 其主要优点为观测范围

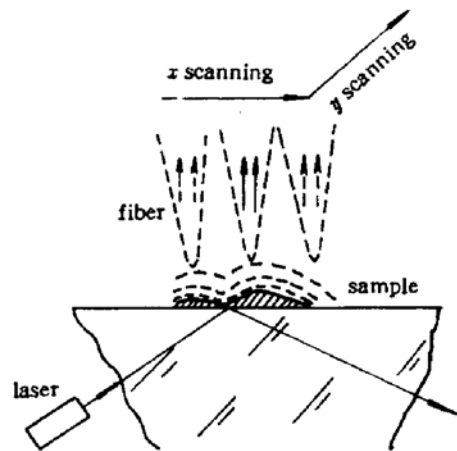


Fig. 1 Schematic diagram of NFOM

宽<sup>[6]</sup>。

### 3 NFOM 系统的要求

光纤探针是 NFOM 的一个关键的部件,它直接关系到系统的分辨率和噪声。要求它均匀变细,且能保证光从光纤探针顶端进入,并不衰减地传播,可用腐蚀法或拉伸法制作。

光源为 3 mW 的 He-Ne 激光器。对 He-Ne 激光器的要求很高,必须保证很高的稳定度。实验采用的激光电源输出电压可自动反馈控制,使激光器的纹波小于 1%。同时尽量减小散射光,使进入光纤探针的光尽可能为反应样品信息的部分。另外电路和图像处理等技术亦用来降低噪声<sup>[6]</sup>。

整个 NFOM 头必须严格隔震。采用多级减震系统,并尽可能在环境振动小的情况下操作,基本达到了要求。

### 4 实 验

实验中对玻璃表面、多种光栅、生物样品等进行了观察,得到了很好的结果。

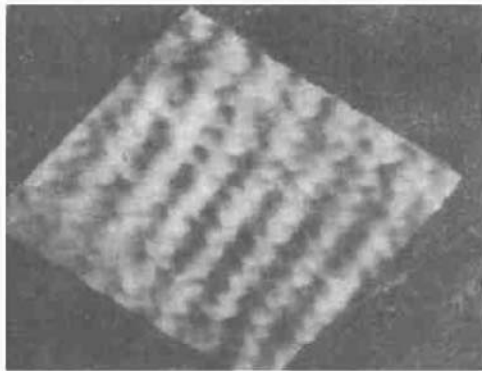


Fig. 2 An image of a grating with a period of 1.6  $\mu\text{m}$  ( $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ )

图 2 为对 1.6  $\mu\text{m}$  的光栅扫描的图像,光栅为位相型,即折射率周期变化,这样的光学特性上的变化用 STM 或 AFM 尚不可能测出来。

可以看出在此图像上约有 7 条光栅,由此证实了系统的扫描范围。

NFOM 的主要优点在于对生物样品的观察。在对鱼鳞片材料的成像中,得到了两方面有意义的结论。

用做样品的鱼鳞片(黑鲤)首先经过清洗,然后在自然情况下脱水。一部分样品放入 1% 的 HCL 溶液中,经过 72 h,鱼鳞片中的矿物质被去

除,成为柔软的透明固体。另一部分样品放入水中多次煮沸,剩下无机质。

鱼鳞片中存在骨胶原分子,根据以往对其宏观热生电(TSDC; Thermally Stimulated Depolarization Current)特性的研究,可以推测骨胶原分子的排列是有序的。

通过 AFM 图像(图 3)从微观上也证明了这一点。图 4 中通过 NFOM 图像也同样证明了鱼鳞片中存在有序的排列。AFM 图像中,当加上切向力时,就会发现在鱼鳞片同时存在着微小的球状物体,这是由于鱼鳞片深层存在着介观物质。在 NFOM 图像中也在条状有规律排列的结构中发现了这种情况。并且由于 NFOM 是基于对物体的光学特性的反应,能够直接体现深层信息,这一点比 AFM 更显优越。通过 AFM 和 NFOM 的观察,可以断定这样的介观物质在光学特性和力学特性上都和周围物质不同。

在对鱼鳞片的观察中,发现了一种有趣的现象(图 5),和鱼鳞片的宏观形态(图 6)相比,观察到的微观图像与其非常类似,均有辐射状条纹,这种情况称为生物全息现象,可以说在自然界和生物体中是非常普遍的,比如蕨类植物的叶等。在此处观察到的这一现象可能是首次用



NFOM 这样一种高分辨率的工具对此进行了证明。由于鱼鳞片中宏观的纹路是由于生长的年轮等因素造成的,而微观的纹路推测是由于大分子的排列有序性构成的,它的生长机理正有待研究。

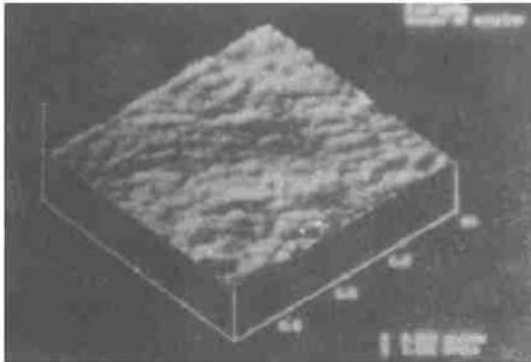


Fig. 3 AFM image of fish scale plates  
(2  $\mu\text{m}$   $\times$  2  $\mu\text{m}$ )

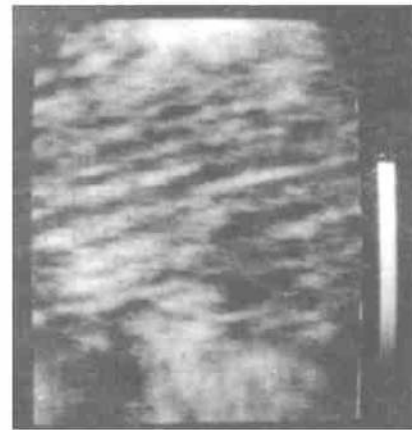


Fig. 4 NFOM image of fish scale plates  
(20  $\mu\text{m}$   $\times$  20  $\mu\text{m}$ )



Fig. 5 NFOM image of fish scale plates  
(20  $\mu\text{m}$   $\times$  20  $\mu\text{m}$ )

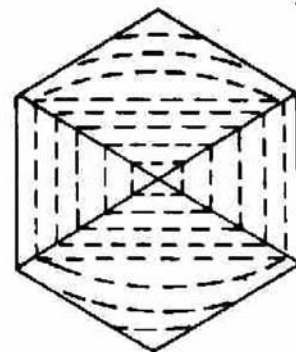


Fig. 6 Macrographic form of fish scale plates

## 5 结果讨论

以上的实验,利用研制的 NFOM 进行了多种样品的观察,证实了该系统的扫描范围、线性、分辨率等多个特性。

在对鱼鳞片样品的观察中,用 AFM 和 NFOM 在微观上得到了和宏观 TSDC 一致的结论。实验表明 NFOM 将是一种对生物样品的有前途的观察工具。

应用 NFOM 对生物分形几何的研究有其独特的优势。因为研究生物在分子水平上的形态结构的最佳工具就是 NFOM。它的扫描范围和分辨率正好在研究大分子结构的区域。此外如前面分析说明的一样,它实际上是传统光学显微镜的发展,观察的仍然是光学特性,这样更能够说明问题。另一方面生物样品导电性差,组织间的差异更多地表现为光学性质上的不同,这是 NFOM 在观察生物样品时优于 AFM 的原因。

**致谢** 工作中得到吴宗汉副教授的帮助,特此感谢。

## 参 考 文 献

- 1 Eric Betzig, Jay K. Trautman. Near-field optics: microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit. *Science*, 1992, **257**:189
- 2 C. K. Carniglia, L. Mandel. Quantization of evanescent electromagnetic waves. *Phys. Rev.*, 1971, **D3**:280
- 3 J. M. Vigoureux, L. D'Hooge, X. Van Labeke. Quantization of evanescent electromagnetic waves; momentum of the electromagnetic field very close to a dielectric medium. *Phys. Rev.*, 1980, **A21**:347
- 4 Gao Duntang, Wang Jiehua, Zhang Baoping *et al.*. Photon scanning tunneling microscopy, 1st Pacific Rim International Conference of Advanced Materials and Processing. Hongzhou, China, 1992. 110
- 5 J. A. Cline, H. Barshatzky, M. Isaacson. Scanned-tip reflection-mode near-field scanning optical microscopy. *North-Holland; Ultramicroscopy*, 1991, **38**:299
- 6 都思丹, 高敦堂, 韩 涛 等. 光子扫描隧道显微镜光探针的研究. *南京大学学报*, 1993, **29**(3):392

## NFOM and the Study of Fish Scale Plates

Han Tao Gao Duntang Du Sidan

*(Department of Information Physics, Nanjing University, Nanjing, 210093)*

**Abstract** The theory of Near Field Optical Microscopy (NFOM) is reviewed. A real system is presented with which the fish scale sample is imaged and analyzed. The results show that NFOM can be applied to study transparent and semi-transparent materials, especially, for living materials. Bioelectret properties caused by orderly orientational arrangement of collagen molecules is proved. By NFOM the bioholographic phenomenon is observed for the first time in  $\mu\text{m}$ -sized fish scale plates.

**Key words** near field optical microscope, bioholography, fish scale