

微球透镜超分辨成像研究进展与发展前景

刘畅 金璐颀 叶安培

北京大学纳米器件物理与化学教育部重点实验室, 北京 100871

摘要 受衍射极限的限制,传统光学显微镜的分辨率只能达到入射光波长的一半。超分辨显微镜已有很多,但制作工艺复杂,适用样品有限,对成像条件要求苛刻,因此应用受到很多限制。研究表明,将直径为几微米至几十微米的透明电介质微球置于样品表面,能显著提高传统光学显微镜的分辨能力,在白光下即可实现超分辨成像,与其他类型显微镜结合使用时也能保持超分辨能力。这种新型透镜为纳米结构和生物样本的实时超分辨成像提供了一种简单、直接的方式。结合本课题组研究结果,介绍并总结了国内外微球透镜的研究进展。

关键词 成像系统; 超分辨成像; 微球透镜; 光子纳米喷射效应; 生物成像

中图分类号 O439 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP53.070003

Progress in and Prospect of Microsphere Optical Nanoscopy

Liu Chang Jin Ludi Ye Anpei

Key Laboratory for the Physics and Chemistry of Nanodevices, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract The resolution of the conventional optical microscope is limited to about half of the incident wavelength because of diffraction limit. Although the super-resolution imaging is realized in many microscopes, their widespread applications are limited due to their complicated design, limited applicable samples and stringent requirement on imaging conditions. Recent researches show that the resolving ability of conventional optical microscopes can be improved significantly when the transparent dielectric microspheres with diameters from several to decades of microns are added on the sample surface, and thus super-resolution imaging with white light illumination is realized. The microspheres can keep their resolving ability when coupled with other types of microscopes. The microsphere nanoscope offers a simple direct way to realize real-time super-resolution imaging for nano-structures and biological samples. We review the research progress in the microsphere nanoscope at home and abroad with our own achievements combined.

Key words imaging systems; super-resolution imaging; microsphere nanoscope; photonic nanojet; biological imaging

OCIS codes 110.0180; 170.3880; 170.0110

1 引言

光学显微成像在许多领域有十分重要的作用。传统光学显微镜无法突破衍射极限的限制,当光源为可见光时,显微镜的分辨率约为 200 nm,实际上,传统光学显微镜已经很难分辨 300 nm 的物体。存在衍射极限的原因在于远场中隐失波的损失。隐失波中带有表示物体精细结构信息的高空间频率谐波,谐波强度随距离的增加呈指数衰减,因此只在近场中存在。

研究人员为使显微镜的分辨率可突破衍射极限,一直努力对显微镜进行优化。用负折射率的超材料制成的超透镜能达到很高的分辨率,但由于光衰减程度非常高,而且不能在白光下工作,因此没有用于生物成

收稿日期: 2016-01-24; **收到修改稿日期:** 2016-03-01; **网络出版日期:** 2016-06-20

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20120001110093)、微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题基金

作者简介: 刘畅(1993—),女,博士研究生,主要从事微纳生物光子学等方面的研究。E-mail: 1501111241@pku.edu.cn

导师简介: 叶安培(1961—),男,教授,博士生导师,主要从事微纳生物光子学等方面的研究。

E-mail: yap@pku.edu.cn(通信联系人)

像。扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)和扫描近场光学显微镜(SNOM)的分辨率也非常高,但 SEM 和 TEM 要求成像样品在真空内,因此不适用于观察活体生物样本,SNOM 通过与样品表面十分接近(约几纳米)的光纤探针对于样品逐点扫描而获得图像,即将激光耦合进探针,以近场的方式照射样品。SNOM 成像所需时间较长,因此不能实现生物组织的实时观测。荧光显微镜常用于生物成像,荧光显微成像技术是通过探测被一定频率的光激发时样品发出的荧光而实现的。该方法面临的主要问题是光漂白,即在光的照射下荧光物质的荧光强度随时间推移而逐渐减弱,因此光照射时间只能限制在几十秒内;而且荧光显微成像要求用荧光分子标记目的蛋白,对蛋白本身是一种伤害,并且一次只能对一种蛋白成像。共聚焦显微镜和固体浸没透镜也可以提高成像质量与分辨率,但两者都是传统显微镜,未能突破衍射极限,分辨率有时不能达到要求。

2011年,Wang等^[1]报道了微球透镜技术,将透明电介质微球置于物体表面,结合传统光学显微镜,可以在白光下得到50 nm的分辨率。研究人员认为,微球能够耦合近场信息并将其放大,传输到远场后被物镜接收。这种简单有效的技术为实时超分辨成像提供了一种新的可能。本文结合本课题组的成像结果介绍了微球透镜的三种类型,归纳总结了影响微球透镜成像的因素以及分辨率评估方式,介绍了微球透镜的应用与发展前景。

2 微球透镜的三种类型

按照微球在介质中的浸没方式,可将微球透镜分为无浸液、微球半浸没、完全浸没三种类型。

2011年,Wang等^[1]将直径为 $4.74\ \mu\text{m}$ 的二氧化硅玻璃微球(折射率 $n=1.46$)置于样品表面,用放大倍数为 $80\times$,数值孔径 $NA=0.9$ 的传统显微镜物镜对其成像,在白光照明条件下获得50 nm的分辨率以及8倍的放大倍数,成像装置如图1所示。微球透镜所成的像为虚像,像在样品表面之下,透镜在反射和透射模式下都可实现高分辨成像。图2所示为Wang等的成像结果,对比了微球透镜成像(ON)结果和SEM成像结果,图2(a)~(d)所示为透射模式下成像,图2(e)~(h)所示为反射模式下成像。

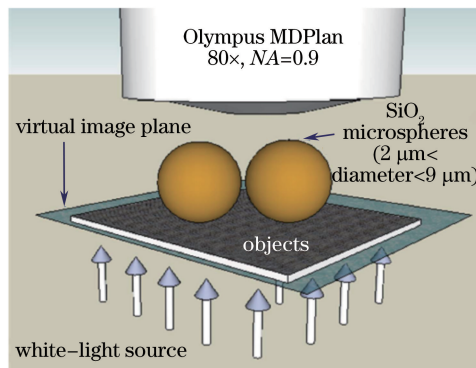


图1 成像装置

Fig. 1 Experimental imaging configuration

Wang等^[1]对微球透镜成像做了进一步分析,认为微球的光子纳米喷射效应是微球透镜超分辨能力的来源^[2]。光子纳米喷射效应反映微球的聚焦特性,当平面波入射时,微球的背光表面附近会产生一个小于衍射极限的聚焦光斑,且在这个被聚焦的区域内,光场得到极大增强,在焦点附近约几倍波长的距离处光斑尺度都小于衍射极限。文中用Mie理论进行了数值模拟,得到光强分布图。Wang等^[1]进一步提出,只有满足一定条件的微球才具有光子纳米喷射效应,只有这些微球才具有高分辨能力,如图3所示。图3(b)中纵轴分辨能力的定义为(聚焦光斑直径-衍射极限)/微球半径,只有该值小于零才具有超分辨能力。横轴尺度参数 q 的定义为 $2\pi a/\lambda$, a 表示微球半径。由此Wang等^[1]得出,折射率大于1.8的微球不适合成像,只有尺度较小的微球才能用于高分辨成像。例如,对 $n=1.46$ 的微球而言,当 $q<70$ 时才可以实现超分辨成像,即入射光的波长为400 nm时微球的直径需要小于 $9\ \mu\text{m}$ 才可以实现高分辨成像。

Hao等^[3]发现微球半浸没后比微球处于空气中时得到的图像更清晰、对比度更高、分辨能力更强,而且

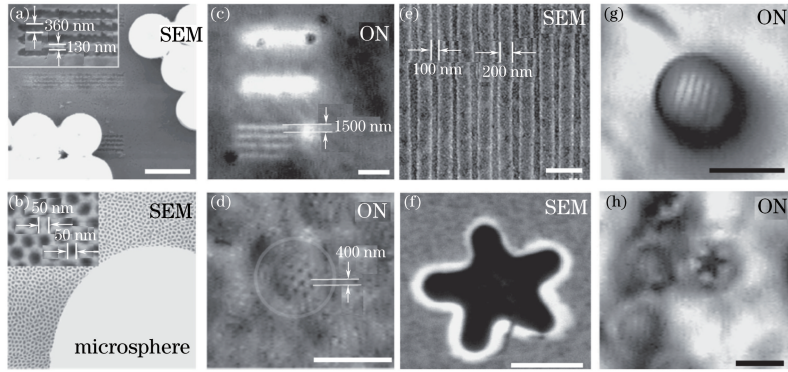


图 2 4 种样品的成像结果。(a)~(d) 透射模式；(e)~(h) 反射模式

Fig. 2 Imaging results of four samples. (a)-(d) Transmission mode; (e)-(h) reflection mode

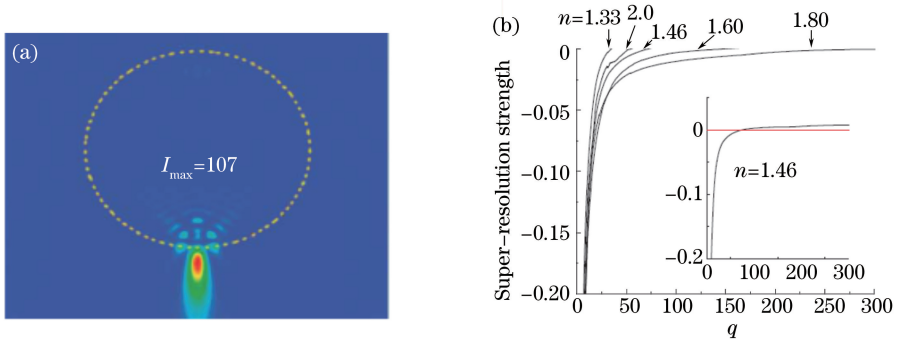


图 3 (a) 微球的光子纳米喷射效应；(b) 分辨能力和微球尺寸的关系(插图描述了 $n=1.46$ 的情况)

Fig. 3 (a) Photonic nanojet; (b) super-resolution strength (the inset specially shows the situation when $n=1.46$)

即使形状有缺陷的微球成像效果也很好,这种方法的缺点是放大倍数有所减小,且液面的蒸发会影响成像。微球完全浸没时则不具有超分辨能力。用直径为 $3\ \mu\text{m}$ 的二氧化硅玻璃微球对蓝光碟成像,无浸液时微球的放大倍数约为 2.7,半浸没在酒精中时,放大倍数随浸液深度的变化而变化,在某一深度下测得放大倍数约为 2。后续实验发现,半浸没的微球对尺度的要求降低,可以用较大尺寸(直径为十几微米)的微球得到类似的结果。为尽量消除液面蒸发的影响,可以对微球进行处理使其具有亲水性,也可以使用不易蒸发的浸液,如显微镜镜头油。成像实验发现对微球作亲水性处理后,随着浸没液体的增多,放大倍数减小。实验还发现微球透镜成像也可以反映物体内部物理性质的改变,而不仅是表面的起伏特征。由于微球透镜成像属于宽场光学成像,因此与样品表面起伏特征相比,样品的光学性质,如反射和透射系数,对成像的影响更大,这对于研究表面形貌改变不大但内部性质有改变的样品十分重要。例如,对于蓝光碟,光刻过程会改变碟片表面的反射率,但其表面条纹并不会改变,对于记录数据前后的蓝光碟,SEM 无法观察到差别,而微球透镜可以观测到记录数据后蓝光碟上的数据点^[4]。

Darafsheh 等^[5]证明高折射率微球完全浸没时也具有超分辨能力。他们将折射率为 1.9 和 2.1 的钛酸钡玻璃(BTG)微球完全浸没在异丙醇(折射率为 1.37)中,得到了超分辨图像,微球直径在 $2\sim 220\ \mu\text{m}$ 之间时,对金纳米颗粒二聚体(NPD)成像,放大倍数在 2.5~4.5 之间变化。

完全浸没的微球成像对微球的大小没有太多限制,可以使用大的微球辅助成像,BTG 微球在直径为 $100\ \mu\text{m}$ 时仍保持了超分辨能力。大尺寸微球的好处是单次的成像范围大^[5]。Darafsheh 等^[6]认为微球能提高分辨率的原因在于系统有效数值孔径的增大,原因在于:1)介质中光波长减小;2)物镜接受光锥增大,任何直径的微球都可以做到这一点。对于空气中微球和物镜的组合系统,几何光学计算得到的数值孔径 $NA_s = n \sin \theta / (2-n)$, n 为微球的折射率,这种情况下可以得到的最大数值孔径为 n 。而对微米量级的微球而言,分辨能力会因为光子纳米喷射效应而进一步增强。由于接受光锥的增大,微球透镜对物镜数值孔径的依赖度降低,因此小数值孔径的物镜也能用于高分辨成像,这对于长工作距离的情况十分有利^[7]。微球透镜可在有水的环境下成像,这一特点在生物成像方面更具应用价值,而且可消除半浸没条件下出现的一些问题

(如液体的挥发使浸没的深度发生变化,导致分辨能力和放大倍数变化),因此完全浸没的微球在实际应用中更具优势^[5]。

本课题组也进行了完全浸没的微球辅助成像研究,成像样品为光栅。光栅基底材料为玻璃,表面镀厚度为 30 nm 的铬。使用离子束刻蚀掉一部分铬形成精细光栅。光栅分上下两区域。上部区域刻蚀掉的部分宽度为 310 nm,存留的铬层宽度为 140 nm,下部区域刻蚀掉的部分宽度为 190 nm,铬层宽度为 120 nm。图 4(a)所示为光栅的 SEM 图像。对条纹宽度为 120 nm、间距为 190 nm 的区域成像,选用物镜数值孔径为 0.85,用折射率为 1.9、直径为 16 μm 的 BTG 微球辅助成像,完全浸没在浸油中(折射率为 1.52)。仅用该物镜无法分辨出光栅条纹,使用微球辅助成像后则可以分辨,并可得到超分辨图像,如图 4(b)所示,图像放大倍数为 2.3。

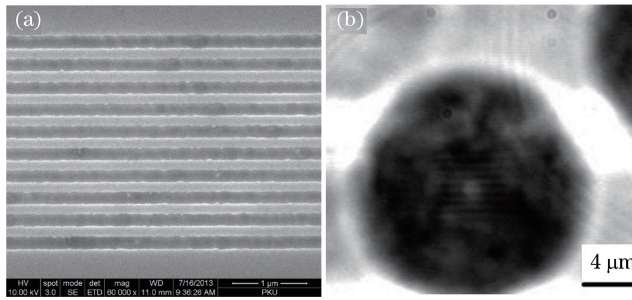


图 4 (a) 光栅 SEM 图像; (b) 光栅微球透镜成像

Fig. 4 (a) SEM image of gratings; (b) microsphere nanoscopic image of gratings

3 影响微球透镜成像的因素

对于微球透镜成像而言,微球及浸液的折射率、微球的直径、成像面的位置(指成像面在样品表面下与表面的距离)、入射光波长以及样品本身都会影响成像结果,成像的放大倍数、分辨率等也会随着这些参数的改变而有所不同,研究人员通过研究这些成像条件,希望获得最佳成像效果。

3.1 折射率

研究微球折射率和浸液折射率之比,即相对折射率对成像的影响。对半浸没微球透镜的研究表明,微球折射率不变时,浸液折射率越大,图像放大倍数越小,且当浸液折射率大于微球折射率时,微球透镜仍具有超分辨能力^[4]。无浸液的微球与完全浸没的微球相对折射率相差较小时,完全浸没的微球成像效果更好、放大倍数更大^[8]。

Lee 等^[9]将直径为 100 μm 的 BTG 微球($n=1.9$)分别浸入水($n=1.33$)、质量分数为 40% 的蔗糖溶液($n=1.399$)与镜头浸油($n=1.518$)中,对蓝光碟成像,改变成像面位置获得最清晰的图像。蓝光碟的条纹宽度为 180 nm,条纹间距为 120 nm。实验中由于微球直径较大,物镜的工作距离不能太小(至少不能小于微球直径),选择 50 \times 、 $NA=0.75$ 的物镜。三种情况下进行成像,蓝光碟条纹均可分辨,但浸没介质为浸油时条纹比例失真,成像情况如表 1 所示。

表 1 不同浸液中的成像情况
Table 1 Imaging in different media

Medium	Refractive index	Relative refractive index	Magnification	One pitch size /nm	Groove size /nm	Focal image position / μm	Focal image range / μm
Water	1.330	1.429	3.3~3.8	1000	600/400	100	70~150
Sugar solution	1.399	1.357	2.5~3.0	850	500/350	62	42~87
Immersion oil	1.518	1.252	2.0~2.5	700	450/250	25	15~45

如表 1 所示,相对折射率越大,像放大倍数越大,最佳成像面位置越深。最佳成像面的位置是指图像最清晰时像面在样品表面下距表面的距离。成像面范围表示像面在此范围内均能获得清晰的超分辨图像。实验表明,在成像范围内,随着像面加深,像放大倍数增大^[9-11]。

为分析成像机制, Lee 等^[9]在坡印廷矢量场中用 Mie 理论进行模拟,研究光子纳米喷射效应。结果表

明,相对折射率越大,最大光强越大,光强最大处也越接近微球表面。文中认为这个位置与微球的分辨能力密切相关,位置越接近表面,微球分辨能力越强。

Yang 等^[12]用有限元方法(FEM)进行数值模拟,研究光子纳米喷射效应中相对折射率对最大聚焦光强和焦点位置的影响,所用微球直径为 $60\ \mu\text{m}$,入射光波长为 $680\ \text{nm}$ 。定义光强最大处为焦点,焦点处光场分布的半峰全宽(FWHM)为光斑直径。研究结果表明,相对折射率在一定范围内增大时,最大光强明显增大,焦点的位置也更接近微球表面,当相对折射率为 1.6 时,焦点在微球表面出现,此时光强最大,而当相对折射率大于 1.6 时,光强会减小,焦点处光斑会增大。实验表明相对折射率在 $1.4\sim 1.75$ 之间时成像效果最佳^[8]。

3.2 微球直径

曹玲等^[13]使用直径为 1.97 、 3.35 、 4.87 、 $7.27\ \mu\text{m}$ 的二氧化硅微球进行成像实验,微球半浸没在酒精中,样品是由直径 $280\ \text{nm}$ 的聚苯乙烯小球制备的二维六角密排的胶体晶体。随着微球直径的增大,放大倍数变化不大,分别为 1.72 、 1.65 、 1.65 、 1.63 。

Darafsheh 等^[5]将 BTG 微球($n=1.9$)浸入异丙醇($n=1.37$)中,对 NPD 成像,实验研究了直径对放大倍数与视场的影响,视场指样品表面可分辨出条纹的圆形区域的直径,实验结果如图 5 所示。

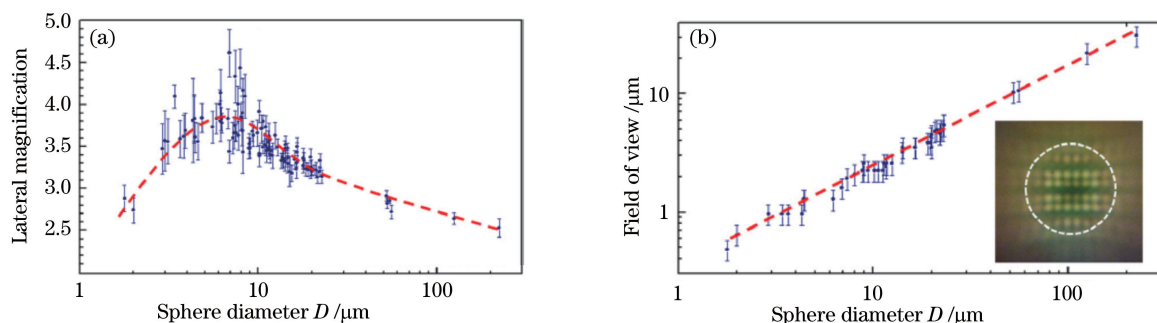


图 5 (a) 放大倍数和 (b) 视场与微球尺寸的关系(插图是一个直径为 $9\ \mu\text{m}$ 的微球的视场)

Fig. 5 (a) Magnification and (b) field of view versus sphere diameter
(the inset illustrates field of view for a sphere with $D=9\ \mu\text{m}$)

视场随微球直径几乎呈线性增加,当直径大于 $200\ \mu\text{m}$ 时视场大于 $30\ \mu\text{m}$ 。微球直径为 $2\sim 6\ \mu\text{m}$ 时,直径越大,放大倍数越大,与低折射率的微球在空气中的情况类似;直径为 $6\sim 10\ \mu\text{m}$ 时,放大倍数达到极大值,在 $3.5\sim 4.5$ 之间变化;直径增大到 $220\ \mu\text{m}$ 时,放大倍数约为 2.5,此时几何光学适用。由于枕形失真,随着像远离光轴,放大倍数增大,因此只取图像中心区域的放大倍数来研究。

Lee 等^[10]用 Mie 理论对坡印廷矢量进行理论计算,研究了光子纳米喷射效应。模拟条件是 $600\ \text{nm}$ 平面波入射,聚苯乙烯微球($n=1.59$,空气中)的直径分别为 30 、 50 、 $100\ \mu\text{m}$ 。结果表明,微球直径越大,最大光强越大,但是焦点位置离微球表面越远。微球可将隐失波转换为传播波,高强度能量可以携带更多亚波长信息,这可能是微球透镜超分辨能力的一个原因。Yang 等^[14]用 FEM 进行数值模拟,微球折射率为 1.92,浸液折射率为 1.52,入射光波长为 $600\ \text{nm}$,并研究了聚焦光斑大小与微球直径的关系。研究结果表明,随着微球尺度的减小,光斑直径也减小,且光斑出现的位置越来越靠近微球表面,研究认为这有益于微球的成像。

3.3 成像面位置

Lee 等^[10]研究了成像面位置对放大倍数的影响,用直径为 $50\ \mu\text{m}$ 和 $100\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球($n=1.59$,空气中)对蓝光碟成像。总体上,随着像面加深,放大倍数增大,但是微球直径同样对其有影响。对直径为 $50\ \mu\text{m}$ 的微球而言,最佳成像面在样品表面下 $120\ \mu\text{m}$ 处,在 $100\sim 140\ \mu\text{m}$ 范围内都能得到非常清晰的超分辨图像,放大倍数在 $5.7\sim 7$ 之间;对直径为 $100\ \mu\text{m}$ 的微球而言,最佳成像面在样品表面下 $300\ \mu\text{m}$ 处,在 $260\sim 300\ \mu\text{m}$ 范围内都能得到非常清晰的超分辨图像,放大倍数在 $7\sim 8$ 之间。

Yang 等^[12]认为,像面在一定的范围内都能得到清晰的超分辨图像的现象,与光子纳米喷射效应中焦点附近约几倍波长的距离内光斑均可保持尺度小于衍射极限的现象相吻合。

3.4 入射光波长

实验中都用白光照明,可见光波长范围为 400~760 nm。Lee 等^[11]理论研究了光子纳米喷射效应,进而推测波长对成像的影响。微球直径为 60 μm ,折射率为 2.2,浸没在水中。平面波入射,波长分别为 400、500、600、700 nm。用 Mie 理论计算坡印廷矢量。取球心为原点,入射光沿 z 轴方向,研究 x - z 平面的电磁场分布。计算 z 轴上光强最大处距微球表面的距离(DMI),在光强最大处计算 y 轴方向上光强的 FWHM,以此来反映可见光照射时的光强分布情况,结果如表 2 所示,表中最后一行是前几行的平均。可见当入射光波长改变时,微球仍具有光子纳米喷射效应,只是光强分布不同。

表 2 不同波长光照射下的光子纳米喷射效应

Table 2 Photonic nanojet for incident plane waves with different wavelengths

λ /nm	FWHM	DMI /nm
400	0.69 λ	5635
500	0.63 λ	5213
600	0.59 λ	4867
700	0.62 λ	5059
Visible	0.63 λ	5194

3.5 成像样品

微球透镜对不同的样品成像结果不同。Wang 等^[1]用直径为 4.74 μm 的二氧化硅玻璃微球成像,样品为光栅时,放大倍数为 4.17,样品为镀金多孔阳极氧化铝薄膜时,放大倍数为 8。

Lee 等^[10]用直径为 30、50、100 μm 的聚苯乙烯微球($n=1.59$)在空气中对蓝光碟和石英基底金纳米点图案成像,样品不同时,相同微球成像图像的放大倍数、最佳成像面等均不同,而且图像的直观性质也有明显不同。样品为蓝光碟时,30 μm 的微球所成的像中间有暗斑,直径为 50 μm 和 100 μm 的微球则没有该缺陷。样品为金纳米点时,微球所成的像中心无暗斑,但是金纳米点会异常增大,因此图像的比例失真。镀金表面可能会有强的表面等离子激元(金属表面自由电子同入射光子相互耦合形成非辐射电磁模式,是局域在金属和介质表面传播的一种混合激发态^[15]),这也许是成像失真的原因。石英基底对成像没有干扰,但是蓝光碟基底的近场信息会传递给微球,因而会影响成像。

Yang 等^[14]用浸在镜头油中直径为 60 μm 的 BTG 微球结合 $63\times$ 、 $NA=1.4$ 的油镜对不同特征尺度的硅纳米结构成像,所得的放大倍数都相同,可以看出,仅改变结构的尺度不会影响成像的放大倍数。

4 分辨率的定义

微球透镜成像时,如果图像有的清晰有的模糊,一般会认为图像越清晰,分辨率越高^[10-11],并且当实验样品能被清晰分辨时,会将该样品的尺度作为微球透镜的分辨率^[1]。为了评估微球透镜的分辨率,首先需要定义分辨率。

对银纳米线(直径为 100 nm)成像,只用 $100\times$ 、 $NA=0.9$ 的物镜时,截面光强分布的半峰全宽是 390 nm,而加上浸入异丙醇中直径为 9.6 μm 的 BTG 微球后,半峰全宽为 230 nm,表明分辨率的提高^[7]。

Darafsheh 等^[5]用微球透镜(BTG 微球,浸在异丙醇中)对 NPD 成像,颗粒间最小间距为 120 nm,光强分布计算结果如图 6 所示。

图 6(a)~(c)中微球半径分别为 4.2、21.5、53 μm ,从图中可判断得出分辨率随着微球直径的增大而减小。使用瑞利判据进一步分析。当一个点物衍射图样的中央主极大与另一点物图样的第一极小重合时,认为系统刚好可以分辨这两个点物,对于缝形光阑,此时两图样重叠区中点的光强约为每个衍射图样中心最大光强的 81%^[16]。对应于图中情况,认为当中心强度为本身强度的 81%时,可以分辨两个强度相等的点。如果选定入射光波长为 550 nm(本来是白光入射),则直径为 4.2 μm 的微球分辨率达到 $\lambda/7$,直径为 53 μm 的微球分辨率达到 $\lambda/4.5$ ^[5]。

Darafsheh 等^[6,17]提出了一种得到分辨率的方法。衍射极限的判据很多,在微球透镜成像中,由于镜头像差和噪声的影响,光强不会降为 0,可以选用 Houston 判据。对于两个强度相同的光源,如果这两个光源

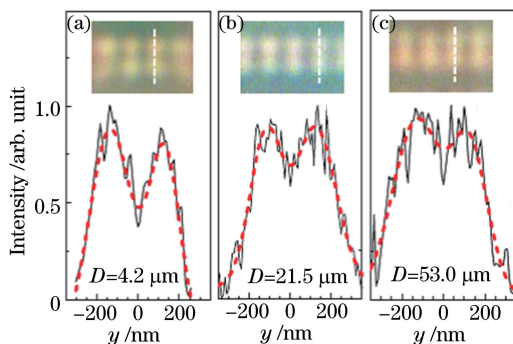


图6 光强分布(插图为对应的微球透镜成像)

Fig. 6 Intensity profiles (the insets show the corresponding microsphere nanoscopic images)

的强度分布中心的距离等于任一点光源强度分布的半峰全宽,则这两个光源刚好可以被分辨。在这种情况下,系统的点扩展函数(PSF,对于光学系统即输入为一点光源时其输出图像的光场分布)的半峰全宽就是系统的分辨率,该值为 $0.515 \lambda / NA$ 。样品经透镜成像的过程可以看作成像系统 PSF 和样品光强分布的卷积,结果即为所成图像的光强分布;同样,PSF 可由图像和样品光强分布的去卷积得到。经典的分辨率定义都是针对点光源和点物的,但是对于有一定大小的物体,如果忽视尺度带来的效应,简单地将其中心距或者边到边的距离作为分辨率,会带来偏差,如图 7 所示,图中 w 表示宽度, g 表示间距。

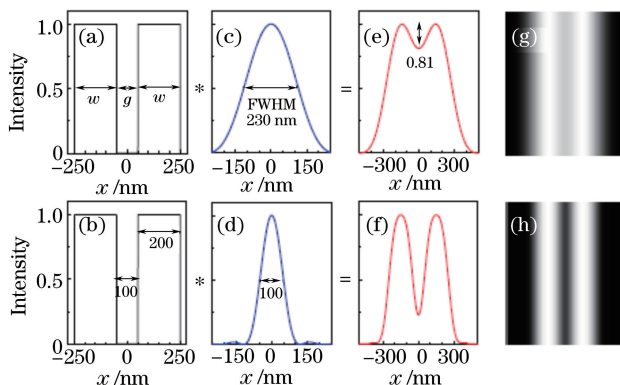


图7 成像分析。(a) (b) 成像样品光强分布;(c) (d) 点扩展函数;(e) (f) 卷积计算得到的图像光强分布;(g) (h) 与图 7(e)、(f) 对应的成像图案

Fig. 7 Imaging analysis. (a) (b) Intensity profiles of object; (c) (d) PSFs; (e) (f) calculated profiles; (g) (h) image patterns corresponding to profiles in Figs. 7(e) and 7(f)

由图 7 可知,对条纹宽度 $w=200$ nm,条纹间距 $g=100$ nm 的样品,用 PSF 半峰全宽为 230 nm(即分辨率为 230 nm)的系统成像,最后图像鞍峰比为 0.81,这时样品条纹刚好可被分辨,即系统的分辨率为 230 nm 时,即可分辨出 100 nm 的物体。当系统的分辨率增加到 100 nm 时,图像的鞍峰比减小,说明图像更清晰。综上所述,当处理有限大小的结构时要注意分辨率的定义,最终确定分辨率需要将图像的光强分布与成像样品光强分布作去卷积计算。下面是应用该判据得到分辨率的一个实例。成像样品为蓝光碟,用数值孔径为 0.9 的物镜时,去卷积运算后系统 PSF 的半峰全宽为 300 nm,加了直径为 $50 \mu\text{m}$ 的 BTG 微球(折射率为 2.1,浸液折射率为 1.41)后,系统 PSF 的半峰全宽变为 135 nm,因此分辨能力提高了一倍,由于入射波长约为 550 nm,因此可认为微球透镜的分辨率为 $\lambda/4$ ^[17]。

5 微球透镜的应用与发展

5.1 微球透镜在生物成像中的应用

生物成像中多用荧光显微镜,但荧光成像存在一定的缺点。Li 等^[18]在无荧光标记条件下,用折射率为 1.9、直径为 $100 \mu\text{m}$ 的 BTG 微球,浸在水中 75 nm 的腺病毒进行成像,成像结果如图 8 所示。共完成两组实验,第一组[图 8(a)、(b)]对比了 SEM 和低倍物镜($50\times$, $NA=0.75$)结合微球成像,此时微球透镜并不能

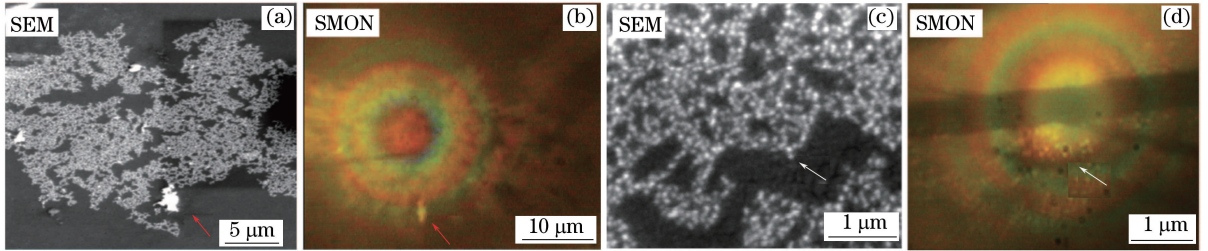


图 8 对腺病毒成像。(a) SEM 成像；(b) 低倍物镜结合浸没微球成像(SMON)；(c) 高倍 SEM 成像；
(d) 高倍物镜结合浸没微球成像

Fig. 8 Imaging of adenoviruses. (a) SEM image; (b) low magnification SMON image; (c) higher magnification SEM image; (d) higher magnification SMON image

分辨出腺病毒。第二组[图 8(c)、(d)]对比高倍 SEM 和高倍物镜($80\times$, $NA=0.9$)结合微球成像,此时微球透镜能分辨出腺病毒,最佳成像面在样品表面下 $70\ \mu\text{m}$ 处。Li 等^[18]还用更高倍的物镜($100\times$, $NA=0.95$)对样品成像,图像也可以分辨,最佳成像面在样品表面下 $80\ \mu\text{m}$ 处,图中没有给出所成的像。

本课题组也用微球透镜进行了无荧光标记生物成像,成像样品为胃癌细胞。图 9(a)所示为单个癌细胞的传统光学显微镜成像,图 9(c)为癌细胞充分成长、大范围占据培养基后层状结构的传统光学显微镜成像,图 9(b)、(d)是对应结构的微球透镜成像,癌细胞浸在磷酸盐缓冲液(PBS)中,用 BTG 微球($n=1.9$,直径约为 $20\ \mu\text{m}$)辅助成像。传统光学显微镜成像时,图 9(a)中单个细胞中的点状结构可以被分辨,边缘趋近于圆形。用微球透镜成像时,从图 9(b)可以看出点状结构依然清晰可辨,被一定程度地放大,且加入微球后可以观察到不规则边缘结构。图 9(c)中大范围占据培养基的细胞由于挤压和折叠原因内部结构分辨效果较差,原本可见的细胞质中斑点大多重叠而难以辨认,只能观察到非常密集而且大部分连在一起的点状结构以及细胞的分界面。如图 9(d)所示,加入微球后,原本难以分辨的点状结构得到了有效放大,可以观察到几个分离的点状物。由此可见,本课题组用微球透镜进行无标记生物成像得到了较好的结果。

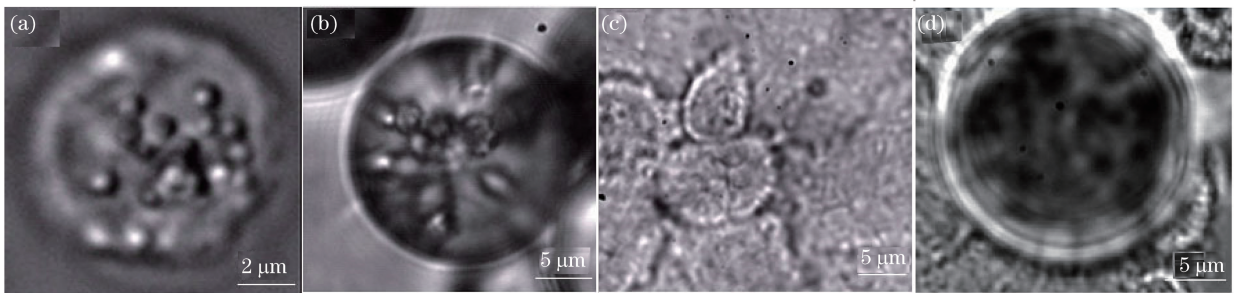


图 9 (a) 传统光学显微镜对单个癌细胞成像；(b) 微球透镜对单个癌细胞成像；
(c) 传统光学显微镜对层状癌细胞成像；(d) 微球透镜对层状癌细胞成像

Fig. 9 (a) Image of a single cancer cell by conventional microscope; (b) image of a single cancer cell by microsphere nanoscope; (c) image of piled cancer cells by conventional microscope; (d) image of piled cancer cells by microsphere nanoscope

微球透镜和荧光显微镜的结合在生物成像方面也得到了很好的成像效果。在荧光显微镜成像中,一般选取像显出最强荧光信号的位置为最佳成像面^[12]。

Yang 等^[12,19]结合微球和荧光显微镜对小鼠肝细胞株(AML12)成像,使用折射率为 1.92、直径为 $60\ \mu\text{m}$ 的 BTG 微球,物镜为 $40\times$ 、 $NA=0.8$ 的水镜,样品浸在 PBS 中。首先对中心粒成像。在真核细胞中,中心粒的柱状结构由 9 束三体微管构成。每个中心体由两个中心粒构成,两者相互垂直。传统光学显微镜只能观察到它们的存在而无法观测到其精细结构,如图 10 所示。图 10(a)中单个中心粒微管蛋白显示为一个模糊的点,而图 10(b)中则可看到环状结构。图 10(c)、(d)是对两个中心粒中的微管蛋白成像,图 10(d)中可以分辨两个中心粒的连接处。

对线粒体和染色体成像的结果如图 11 所示。从图中可以看出,有微球时两者复杂的形态结构能更好地

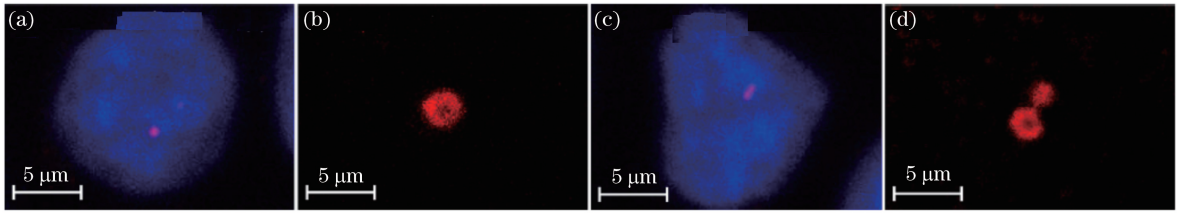


图 10 (a) 传统显微镜对单个中心粒成像；(b) 微球透镜对单个中心粒成像；
(c) 传统显微镜对两个中心粒成像；(d) 微球透镜对两个中心粒成像

Fig. 10 (a) Image of a single centriole by conventional microscope; (b) image of a single centriole by microsphere nanoscope; (c) image of two centrioles by conventional microscope; (d) image of two centrioles by microsphere nanoscope

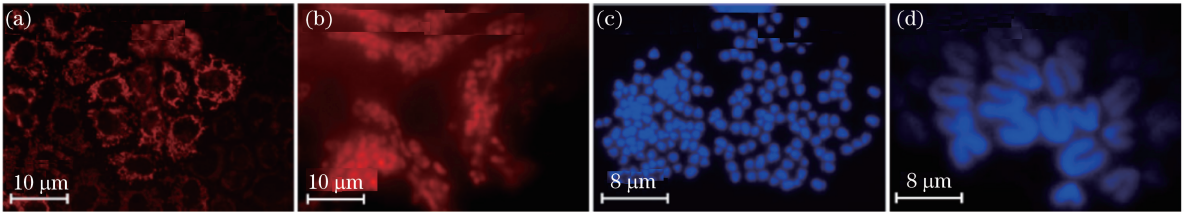


图 11 (a) 传统显微镜对线粒体成像；(b) 微球透镜对线粒体成像；(c) 传统显微镜对染色体成像；(d) 微球透镜对染色体成像
Fig. 11 (a) Image of mitochondria by conventional microscope; (b) image of mitochondria by microsphere nanoscope;
(c) image of chromosomes by conventional microscope; (d) image of chromosomes by microsphere nanoscope

被分辨。实验中所用水镜视场较大,视野中可看到许多微球,即一次可对多个精细结构进行高分辨成像,这对生物研究至关重要,因为生物学中需要大面积的覆盖研究来得到具有统计相关性的结论。

微球辅助成像时,一般将微球浸入液体中,Darafsheh 等^[17]对此加以改进,将微球嵌入透明固化膜中。微球在固化膜中而不是在浸液中成像最大的好处(尤其对于生物样本)是膜可以提前制备并可当作盖玻片使用,并且成像可以在倒置显微镜中进行,基本消除了液体蒸发对成像的潜在影响。固化膜制备过程如下:BTG 微球置于盖玻片基底上,液状聚二甲基硅氧烷(PDMS)人造橡胶(折射率为 1.41)和硬化复合物用旋涂的方式覆于微球上,膜的厚度可由旋涂的时间和速度决定,最后烤干即可,这种情况下微球完全浸没在 PDMS 中。另一种可移动微球成像薄膜是将微球半浸没,介质为 SU-8 胶,所用微球为二氧化硅微球,在微球上滴加稀释的 SU-8 胶进行甩胶,可以通过调整甩胶机的转速制备出不同浸没深度的微球成像系统,然后进行烘干^[20]。

Darafsheh 等^[17,21-22]对人胶质母细胞瘤 U87 细胞成像,加上 BTG 微球盖玻片,其中的间隙用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染液(折射率为 1.45)充满,倒置荧光显微镜成像,20×、NA=0.4 物镜。像中会出现红点,即 γ -H2AX(一种磷酸化组蛋白)焦点,表示脱氧核糖核酸(DNA)双链断裂,这是成像前用临床质子束照射激发的结果,不用微球时则无法分辨出该焦点。成像时用 DAPI 溶液和 γ -H2AX 抗体分别标记细胞核和焦点形成的位置。DNA 损伤尤其是 DNA 双链断裂损伤后,在断裂位点会出现 γ -H2AX 形成的焦点。这种效应对预测癌症病人对放射疗法的反应具有实用价值,可以通过观察 DNA 双链断裂的修复来评估癌细胞对电离辐射的敏感性。操作方法如下:细胞被射线照射后,每隔一段时间对核内 γ -H2AX 焦点计数来确定消失的焦点的数目,焦点消失表示由辐射造成的 DNA 损伤被修复。有研究表明,除焦点数量之外,焦点的质量(如大小、聚集程度)也会决定损伤修复的可能性,当焦点光斑增大时细胞存活的可能性降低,因此研究细胞对射线的敏感程度时焦点的性质也要加以考虑。大的光斑可能与射线引起的更大、更复杂的 DNA 损伤有关,由于这样的损伤很难或不能被修复,大的光斑可能说明细胞被杀死的可能性更高。由于现在无法研究焦点的特征,因此对这些大的、复杂的光斑的本质几乎一无所知。传统光学显微镜的分辨率有限,无法得知光斑聚集程度和所用射线类型的关系等重要信息。微球透镜的分辨率更高,可得到更加细致的图像,能够通过焦点光斑的复杂程度而不是大小将其分类,可将光斑复杂程度和细胞生存的可能性联系起来,再与病人存活的可能性联系起来。

Darafsheh 等^[6,22]还对小鼠肾组织切片成像。大部分影响肾脏功能的肾小球疾病都是通过肾脏切片的组织学分析诊断得到的。要了解疾病的严重程度,需要对切片样本有更高的成像分辨能力,一般用电子显微镜或其他高分辨成像方式,都需要对样品进行许多额外处理。微球透镜成像也可以提高分辨率,为诊断提供一种更简单、经济的方式。Myo1c 和 ZO-1 这两种蛋白对于保持肾小球中足细胞的结构和功能非常重要,它们的缺失会严重影响肾功能,因此如果在足细胞细胞膜内发现这两种蛋白,表明结构正常。实验中对小鼠肾脏切片进行免疫组织化学染色:Myo1c(红光)和 ZO-1(绿光)。将直径为 80 μm 、折射率为 2.1 的 BTG 微球透镜浸没在抗荧光猝灭封片液中,为样品封片,结合落射荧光显微镜,用 25 \times 、NA=0.8 的油镜成像。对比有无微球时的成像,如图 12 所示,有微球时成像能力明显提升,可明显分辨出 Myo1c 和 ZO-1,无微球时很难注意到 Myo1c 和 ZO-1 的共存。从研究的角度看,微球透镜用于分析肾小球各种细胞内蛋白分布方式的改变时效果很好。

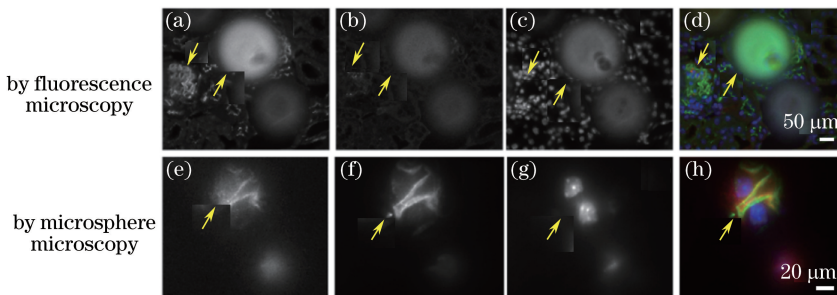


图 12 染色后肾小球的成像。(a) Myo1c; (b) ZO-1; (c) DAPI 染色后; (d) 图 12(a)~(c)的综合;
(e) Myo1c; (f) ZO-1; (g) DAPI 染色后; (h) 图 12(e)~(g)的综合

Fig. 12 Imaging of glomeruli stained. (a) Myo1c; (b) ZO-1; (c) stained with DAPI; (d) composite image of Figs. 12(a)-(c); (e) Myo1c; (f) ZO-1; (g) stained with DAPI; (h) composite image of Figs. 12(e)-(g)

5.2 微球透镜与其他透镜的结合使用

Yan 等^[23]将二氧化硅微球、聚苯乙烯微球与传统的激光扫描共聚焦显微镜(SLCM)结合,在波长为 408 nm 的照射光下获得了 25 nm 的分辨率。激光扫描共聚焦显微镜用聚焦的激光作为照明光,用单束激光以光栅扫描的方式扫描焦平面,由物镜聚焦在样品表面。反射光由物镜收集,透过针孔后用光电倍增管来探测强度,光子均来自物镜焦点处。只基于一个被照明的点的反射光强,在扫描中逐渐收集光强并将这些点光强相加得到一幅完整的图像,即运用逐点扫描技术,而不是直接将宽场像投影到 CCD 上。图 13(a)所示为装置图,图 13(b)为装置中的光路。

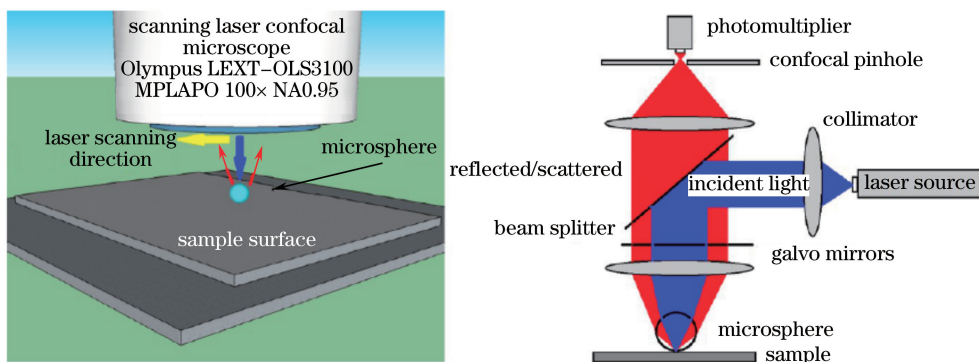


图 13 (a) 实验装置; (b) 光路

Fig. 13 (a) Schematic of experimental configuration; (b) optical path

图 14 所示为对直径 40 nm 的 Ag 纳米线(NW)成像,图 14(a)为 SEM 图像,图 14(b)为传统激光扫描共聚焦显微镜图像,图 14(c)为加入直径 5 μm 的二氧化硅微球后的图像。对比图 14(b)、(c),可看出微球提高了分辨能力。成像样品还有阳极氧化铝模板和最小间距为 25 nm 的金纳米点图案,传统激光扫描共聚焦显微镜不能分辨这些样品,但是加入微球后可以分辨。共聚焦显微镜并不是宽场显微镜,而是基于逐点扫描技

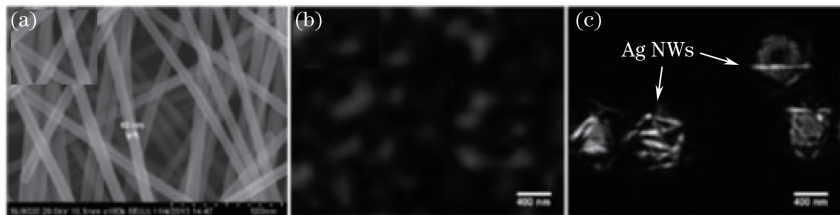


图 14 对直径 40 nm 的银纳米线成像。(a) SEM 图像；(b) 传统 SLCM 图像；(c) 微球结合 SLCM 图像
Fig. 14 Images of Ag nanowires with diameter of 40 nm. (a) SEM image; (b) conventional SLCM image; (c) microsphere-assisted SLCM image

术的,但是仍能与微球成像技术成功结合。

Allen 等^[24]用深紫外光作为照明光,发现微球透镜同样具有超分辨能力。研究者用直径为 $5\ \mu\text{m}$ 的二氧化硅微球,半浸没在异丙醇中(可以提高成像质量),用波长为 248 nm 的光照明,对金纳米等离子体阵列成像。通过实验测得光强分布曲线,用点扩展函数和卷积理论计算,得出分辨率为 $55\sim 60\ \text{nm}$,即 $\lambda/4$ 。他们认为局域表面等离激元共振与超分辨成像机理之间的联系,可以用不同波长的光照射不同金属制成的结构共振激发带间跃迁来进行研究。

Wang 等^[25]将微球连在内窥镜的最末端,获得了约 $\lambda/5$ 的体外分辨率。实验用直径为 $30\sim 100\ \mu\text{m}$ 的 BTG 微球,内窥镜使用渐变折射率透镜,施加预应力使渐变折射率透镜、微球、样品三者接触,微球浸入水中,如图 15(a)所示。照射光为白光时,对条纹间距为 270 nm 的数字多功能光盘(DVD)成像,仅有渐变折射率透镜($NA=0.46$)时不能分辨,加入微球后可以分辨,图像放大倍数为 1.6,所成图像如图 15(b)所示。进一步实验表明,在荧光模式下与微球结合的内窥镜同样具有超分辨能力。数值模拟发现与没有透镜时相比,将微球加在渐变折射率透镜上时光场分布几乎没有变化,所以也不会影响微球的近场聚焦特性,因此渐变折射率透镜不会破坏微球的超分辨能力;有了透镜后,最大光强增大,可能更利于超分辨成像。可见微球可以和渐变折射率透镜成功结合。

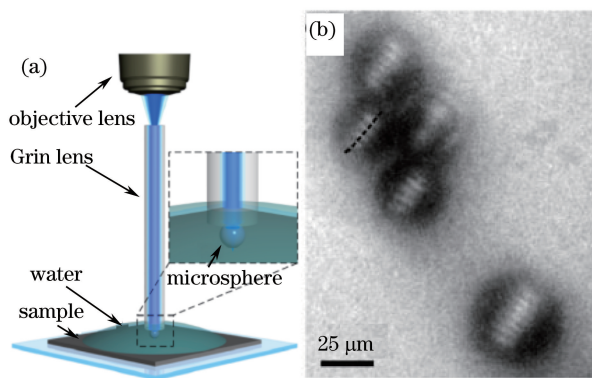


图 15 (a) 实验装置图；(b) 微球内窥镜对 DVD 成像

Fig. 15 (a) Experimental configuration of microsphere based super-resolution endoscopy; (b) DVD imaged by microsphere-functionized endoscopy in white-light mode

6 结束语

微球透镜可以实现超分辨成像,并且可以和多种光学显微镜,例如荧光、非荧光显微镜,宽场、点扫描显微镜,结合使用而保持其本身的超分辨能力,为辅助光学显微镜成像并提高分辨率提供了一种简单的方法,具有广阔的应用前景。微球透镜的成像机制仍在讨论中,目前认为其超分辨能力与光子纳米喷射效应、表面等离激元、电介质微球的回音壁模式、近场的增强等因素有关。由于成像机制尚不清楚,无法在成像前预估其分辨率及放大倍数,这对实际应用造成很大的限制,如果能解决这个难题,其实用价值会大大提高,该技术才能真正得以发展。

参 考 文 献

- 1 Wang Z, Guo W, Li L, *et al.*. Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope[J]. Nature Communications, 2011, 2: 218.
- 2 Chen Z, Taflove A, Backman V. Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles: A potential novel visible-light ultramicroscopy technique[J]. Optics Express, 2004, 12(7): 1214-1220.
- 3 Hao X, Kuang C, Liu X, *et al.*. Microsphere based microscope with optical super-resolution capability[J]. Applied Physics Letters, 2011, 99(20): 203102.
- 4 Hao X, Kuang C, Li Y, *et al.*. Hydrophilic microsphere based mesoscopic-lens microscope (MMM) [J]. Optics Communications, 2012, 285(20): 4130-4133.
- 5 Darafsheh A, Walsh G F, Dal Negro L, *et al.*. Optical super-resolution by high-index liquid-immersed microspheres[J]. Applied Physics Letters, 2012, 101(14): 141128.
- 6 Darafsheh A, Guardiola C, Nihalani D, *et al.*. Biological super-resolution imaging by using novel microsphere-embedded coverslips[C]. SPIE, 2015, 9337: 933705.
- 7 Darafsheh A, Limberopoulos N I, Derov J S, *et al.*. Optical microscopy with super-resolution by liquid-immersed high-index microspheres[C]. SPIE, 2013, 8594: 85940C.
- 8 Darafsheh A, Limberopoulos N I, Derov J S, *et al.*. Advantages of microsphere-assisted super-resolution imaging technique over solid immersion lens and confocal microscopies[J]. Applied Physics Letters, 2014, 104(6): 061117.
- 9 Lee S, Li L, Wang Z, *et al.*. Immersed transparent microsphere magnifying sub-diffraction-limited objects[J]. Applied Optics, 2013, 52(30): 7265-7270.
- 10 Lee S, Li L, Ben-Aryeh Y, *et al.*. Overcoming the diffraction limit induced by microsphere optical nanoscopy[J]. Journal of Optics, 2013, 15(12): 125710.
- 11 Lee S, Li L. Rapid super-resolution imaging of sub-surface nanostructures beyond diffraction limit by high refractive index microsphere optical nanoscopy[J]. Optics Communications, 2015, 334: 253-257.
- 12 Yang H, Moullan N, Auwerx J, *et al.*. Super-resolution biological microscopy using virtual imaging by a microsphere nanoscope[J]. Small, 2014, 10(9): 1712-1718.
- 13 Cao Lingling, Yao Ling, Ren Jie, *et al.*. Optical super-resolution imaging properties of microscale spherical lenses with different sizes[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2014, 37(3): 48-53.
曹玲玲, 姚 岭, 任 杰, 等. 微球尺寸对其超分辨成像性质的影响[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2014, 37(3): 48-53.
- 14 Yang H, Gijs M A M. Optical microscopy using a glass microsphere for metrology of sub-wavelength nanostructures[J]. Microelectronic Engineering, 2015, 143: 86-90.
- 15 Ming Hai, Wang Xiaolei, Wang Pei, *et al.*. The control research and application of surface plasmon polaritons [J]. Chinese Science Bulletin, 2010, 55(21): 2068-2077.
明 海, 王小蕾, 王 沛, 等. 表面等离激元的调控研究与应用[J]. 科学通报, 2010, 55(21): 2068-2077.
- 16 梁铨廷. 物理光学(四版)[M]. 北京: 电子工业出版社, 2012: 173-180.
- 17 Darafsheh A, Guardiola C, Palovcak A, *et al.*. Optical super-resolution imaging by high-index microspheres embedded in elastomers[J]. Optics Letters, 2015, 40(1): 5-8.
- 18 Li L, Guo W, Yan Y, *et al.*. Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy[J]. Light: Science & Applications, 2013, 2(9): e104.
- 19 Yang H, Moullan N, Auwerx J, *et al.*. Determination of sub-diffraction-limited organelles and biomolecules using microsphere lenses in combination with fluorescence microscopy[C]. SPIE, 2015, 9328: 932804.
- 20 Liu Shuai, Ye Ran, Cao Lingling. Fabrication of removable superlens and research of its characteristics[J]. Journal of Applied Optics, 2014, 35(3): 427-431.
刘 帅, 叶 燃, 曹玲玲. 一种可移动超分辨成像系统的制备及其性质研究[J]. 应用光学, 2014, 35(3): 427-431.
- 21 Darafsheh A, Guardiola C, Finlay J, *et al.*. Super-resolution imaging by high-index microspheres embedded in an elastomer layer[C]. Novel Techniques in Microscopy 2015, Vancouver, 2015: NM2C.5.
- 22 Darafsheh A, Guardiola C, Finlay J, *et al.*. Simple super-resolution biological imaging[J/OL]. SPIE Newsroom, 2015

- (2015-04-29) [2015-12-25] <http://spie.org/newsroom/technical-articles/5912-simple-super-resolution-biological-imaging-highlight=x2416&ArticleID=x113361>.
- 23 Yan Y, Li L, Feng C, *et al.*. Microsphere-coupled scanning laser confocal nanoscope for sub-diffraction-limited imaging at 25 nm lateral resolution in the visible spectrum[J]. ACS Nano, 2014, 8(2): 1809-1816.
- 24 Allen K W, Liberman V, Rothschild M, *et al.*. Deep-UV microsphere-assisted ultramicroscopy[C]. 17th International Conference on Transparent Optical Networks, Budapest, 2015.
- 25 Wang F, Lai H S S, Liu L, *et al.*. Super-resolution endoscopy for real-time wide-field imaging[J]. Optics Express, 2015, 23(13): 16803-16811.