

基于微球调制光场的超分辨成像及荧光增强

邱雪¹, 王保举^{1*}, 刘海春², 詹求强^{1*}

¹华南师范大学华南先进光电子研究院光及电磁波研究中心, 广东 广州 510006;

²皇家理工学院应用物理系, 瑞典 斯德哥尔摩 SE-10691

摘要 微球可实现光场的调制, 能够将入射光束聚焦于微球背面一个极窄区域, 使得出射光束半峰全宽小于光学衍射极限, 且聚焦强度远远高于入射光场强度。此外, 微球具有高数值孔径特性, 能够提高探测信号的收集效率。基于所述优势, 微球为实现光学超分辨成像以及荧光增强提供了新思路 and 实现途径。相比传统技术, 基于光学微球的超分辨成像及荧光增强技术更简便、更直接且易于实现, 其成像及增强效果均可媲美传统超分辨技术与荧光增强技术, 在生物成像及医学检测方面, 具有重要的研究价值和应用前景。近年来, 关于微球调制光场实现荧光增强的研究取得了较大发展, 但与之相关的综述论文仍较少。系统总结阐述微球增强荧光发光以及微球调制光场技术, 对于该领域的未来研究发展极为重要。首先介绍基于微球的光学超分辨成像, 包括明场超分辨成像和荧光超分辨成像; 然后阐述基于微球的荧光增强研究, 包括现象研究、机制探索以及影响因素讨论等; 最后, 总结微球超分辨成像及荧光增强进展和技术应用, 分析并展望该技术领域的未来发展挑战和趋势。

关键词 光场调控; 微球超分辨; 明场超分辨; 超分辨荧光成像; 荧光增强

中图分类号 O439

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP220830

Super-Resolution Imaging and Fluorescence Enhancement Based on Microsphere-Mediated Light Field Modulation

Qiu Xue¹, Wang Baoju^{1*}, Liu Haichun², Zhan Qiuqiang^{1*}

¹Centre for Optical and Electromagnetic Research, South China Academy of Advanced Optoelectronics, South China Normal University, Guangzhou 510006, Guangdong, China;

²Department of Applied Physics, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm SE-10691, Sweden

Abstract Microspheres can modulate the light field and focus the incident beam into an extremely narrow area on the back of the microsphere, so that the incident beam's full width at half maxima is smaller than the optical diffraction limit, and the focused intensity is considerably higher than the incident one. In addition, the microspheres have high numerical aperture characteristics, which can improve the collection efficiency of detection signals. Based on these benefits, microspheres offer a novel concept and method for realizing optical super-resolution imaging and fluorescence enhancement. Super-resolution imaging and fluorescence enhancement technologies based on optical microspheres are simpler, more direct, and easier to implement than traditional technologies. Their imaging and enhancement effects are comparable to those of traditional technologies. They have significant research value and application prospects in biological imaging and medical detection. Although the studies on microsphere-modulated light field to achieve fluorescence enhancement has made significant progress in recent years, review papers focusing on this topic are still limited. A systematic summary of microsphere-enhanced fluorescence and microsphere-modulated light field is critical for future studies and developments in this field. First, microsphere-based optical super-resolution imaging, including bright field super-resolution imaging and fluorescence super resolution imaging, is introduced. Subsequently, the microspheres-based fluorescence enhancement research is described, including phenomenon research, mechanism exploration, and discussion of influencing factors. Finally, the progress and applications of microsphere-based super-resolution imaging and fluorescence enhancement are summarized, and the future development challenges and trends in this field are discussed and prospected.

收稿日期: 2022-02-28; 修回日期: 2022-03-29; 录用日期: 2022-04-16; 网络首发日期: 2022-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(62122028, 11974123, 62105106)、广东省基础与应用基础研究基金(2018B030306015, 2022A1515011395)、中国博士后科学基金(2021M691089)

通信作者: *zhanqiuqiang@m.scnu.edu.cn; *baoju.wang@m.scnu.edu.cn

Key words light field modulation; microsphere super-resolution; bright-field super-resolution; super-resolution fluorescence imaging; fluorescence enhancement

1 引言

光学显微镜是科技发展长河中的伟大发明,将人类的认知从宏观世界引入微观世界。随着人类对微观世界的不断探索,尤其在生物医学领域,传统光学显微成像技术已不能满足现有的科学研究与应用。由于光学衍射效应,光学显微成像技术一直存在分辨率受限问题。根据阿贝(Abbe)定理^[1]和瑞利判据^[2],传统光学显微镜的横向分辨率一般局限在 200 nm,轴向分辨率局限在 500 nm。如何打破这些传统局限提高分辨率,实现亚细胞结构甚至生物大分子水平的观测一直是光学成像领域的追求与挑战。

近年来,突破光学衍射极限的超分辨显微成像技术取得了巨大进展,如光激活定位显微技术(PALM)^[3-4]、随机光学重构显微技术(STORM)^[5]、受激发射损耗显微技术(STED)^[6-7]和结构光照明显微技术(SIM)^[8-9]。部分荧光超分辨成像技术虽已实现商业化,但为满足未来更多应用需求,这些技术仍然面临一些挑战。例如:如何更好兼顾时空分辨率;如何简化光学系统复杂度;如何增强活细胞应用场景等。此外,近年来多种新型超分辨成像技术相继出现,如基于荧光随机涨落的超分辨成像(SOFI)^[10]、径向涨落超分辨成像(SRRF)^[11]、基于最少光子数的纳米尺度定位技术(MINIFLUX)^[12]以及膨胀显微成像技术(ExM)^[13]等,这些技术都有各自的优势和特色,但也存在图像重构伪影,样品选取、处理复杂等一种或多种问题。因此,发展一种系统简单、成像效果好、可直接成像的超分辨成像技术具有重要价值。

上述典型的超分辨成像技术多依赖于荧光发光。荧光是自然界中常见的光致发光现象,在照明、显示、检测、传感、荧光标记、生物成像等领域具有广泛应用。为实现荧光信号的高精准与高灵敏探测,在实际应用中通常要求荧光材料具有大的光吸收截面、高的荧光量子产率和良好的荧光稳定性等特性,然而,同时具备以上条件的荧光材料甚少。在显示成像领域,材料的荧光属性占有举足轻重的地位,荧光信号的强弱直接决定了照明显示与成像的质量。因此,研究荧光增强意义重大。近年来,已实现基于表面等离子体共振(SPR)^[14-15]、光子晶体工程(PCE)^[16]和掺杂^[17-18]等技术的荧光增强。但基于表面等离子体共振作用的荧光增强金属纳米结构在空气中易氧化、对外界因素高度敏感、稳定性不足;基于光子晶体工程的荧光增强技术受到激发波长固定、荧光材料制备严格、近场配置复杂的限制;基于原子或离子掺杂原材料的荧光增强技术可

能会改变材料本身的结构,影响材料其他性质,且不易实现全波段的发射增强。综上,已有的技术难以成为简单通用的荧光增强方案。因此,发展一种简便易行、适应性强的全光谱荧光增强技术意义很大。

微球对光场的调控恰好为实现前述两个目标提供了新的方案。2011年,英国曼彻斯特大学研究团队报道了一种基于透明介质微球的实时超分辨成像技术,该技术既高效实现了传统显微镜中白光照明下 50 nm 的超分辨成像,又为荧光超分辨成像及荧光增强带来了新思路^[19]。

研究人员发现,微球能够将入射光场聚焦成超越光学衍射极限的小光斑,即光斑的半峰全宽可小于经典衍射极限^[20],这在一定程度上解释了微球具有超分辨成像能力的原因。更重要的是,微球具有出色的光场调制能力,它能够将入射光场聚焦在极窄区域内,使得出射光场强度远高于入射光场强度^[21]。在荧光发光过程中,这等效于集中且提高了激发光的光场强度。同时,由于高数值孔径(NA)特性,微球还能够收集更多荧光信号,提高荧光收集效率^[22]。微球无疑是一种增强荧光信号的重要手段,受到国内外相关研究者的关注。相比传统的荧光增强策略,基于微球的荧光增强方案更简单、光谱覆盖范围更广泛,且增强效果良好。

首先介绍基于微球的光学超分辨成像技术,包括明场超分辨成像和荧光超分辨成像;随后介绍基于微球的荧光增强研究,包括现象研究、机制探索以及影响因素讨论等;最后,总结微球超分辨成像及荧光增强进展和技术应用,分析并展望该技术领域的未来发展挑战和趋势。图 1 为微球调控光场的示意图以及微球超分辨成像和增强荧光的发展历程图。

2 微球种类

目前用于超分辨成像及荧光增强的微球一般采用高折射率介电材料(一般将折射率记为 n),如聚苯乙烯(PS, n 为 1.59)、熔融石英(SiO_2 , n 为 1.46)、二氧化钛(TiO_2 , n 为 2.1)、钛酸钡(BaTiO_3 , n 为 1.9~2.2)等。微球直径(一般记为 d)多在几微米至几十微米之间,也有少数微球直径可达几百微米。因为单个微球的成像视野及增强倍数有限,所以微球超分辨成像及荧光增强研究也常选用微球阵列形式。

通常微球阵列可以通过自组装的方式来制备,即在平衡条件下,让微球自发形成有序的阵列结构。常用方法是将样品稍稍倾斜放置,然后用移液枪吸取分散有微球的悬浊液,悬垂于样品较高的一端,缓慢滴

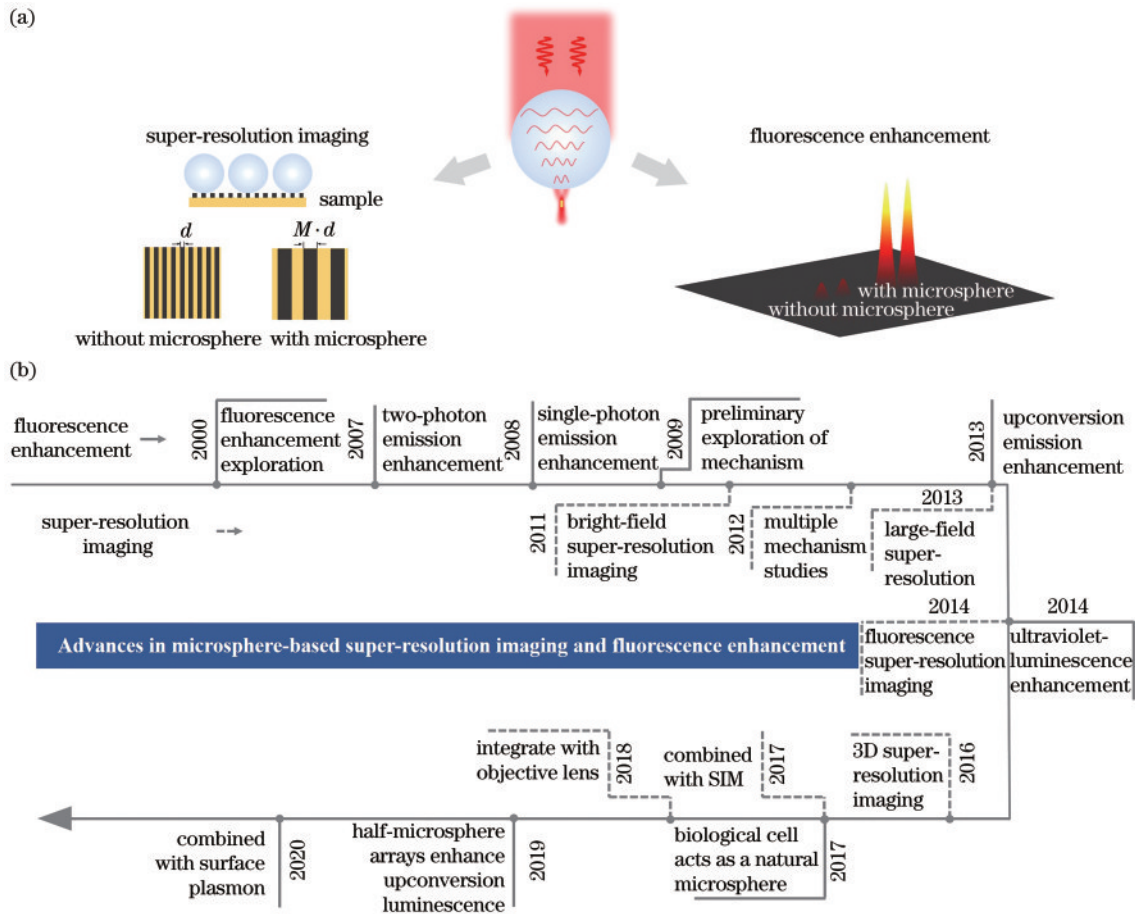


图 1 微球调控光场示意图和微球超分辨成像及增强荧光的发展历程。(a)微球调控光场示意图;(b)微球超分辨成像及增强荧光的发展历程图

Fig. 1 Schematic diagrams of microsphere-mediated light field modulation and the development process of super-resolution imaging and fluorescence enhancement through microsphere. (a) Schematic diagram of microsphere-mediated light field modulation; (b) the development process of super-resolution imaging and fluorescence enhancement through microsphere

落,待液滴逐渐蒸发后,微球会在样品上形成单层紧密排布的微球阵列。实验中则可以视情况在微球之上添加浸液,若需要将微球嵌入薄膜中,如聚二甲基硅氧烷(PDMS)薄膜,则可以通过甩胶机在微球阵列上涂覆一层PDMS,再加热固化即可^[23]。

3 基于微球的超分辨成像

3.1 基于微球的明场超分辨成像

2011年,Wang等^[19]报道了一种基于透明介质微球的明场超分辨成像技术,如图2(a)所示,他们将折射率为1.46,直径在2~9 μm之间的SiO₂微球置于样品表面,在传统显微镜中,利用中心波长为600 nm的白光照明,在放大倍数为80×、数值孔径为0.9的物镜下获得了分辨率高达50 nm的超分辨成像。这种技术在反射和透射模式下均可实现超分辨成像,图2(b)是其在反射(上)和透射(下)模式下的成像图。相比于其他超分辨成像技术,该技术可实现无标记明场超分辨成像,且简单有效,易于实现。同年,浙江大学研究团队发现SiO₂微球在乙醇半浸没下所得成像结果更清

晰,对比度更高,如图2(c)所示,右边乙醇半浸没下所得蓝光光盘的条纹对比度比左边无浸液下更高,表明微球周围环境的折射率对于微球成像效果具有影响^[24]。2012年,有研究者指出高折射率微球在液体完全浸没下也能实现超分辨成像,他们分别将折射率为1.9、直径在5~20 μm范围内的BaTiO₃微球和折射率为2.1、直径为53 μm的BaTiO₃微球完全浸没在折射率为1.37的异丙醇溶液中,均实现了对宽度为200 nm、间距为100 nm的蓝光光盘条纹的清晰成像,如图2(d)所示^[25]。然而,微球成像过程中浸液会挥发,半浸没或浸没状态难以控制,无法长时间成像,因此,又有研究者指出可将微球嵌入PDMS薄膜中,并通过控制薄膜厚度来控制微球浸没深度^[23]。

上述的无浸没、半浸没、完全浸没这3种浸没方式是微球超分辨成像中的主要方式,其本质是形成微球折射率与环境折射率的差。研究发现,在完全浸没的情况下,微球折射率与环境折射率之比越大时,成像放大倍数越大,成像越清晰。图3(a)中,折射率为1.9、直径为100 μm的BaTiO₃微球分别被水(n 为1.33)、

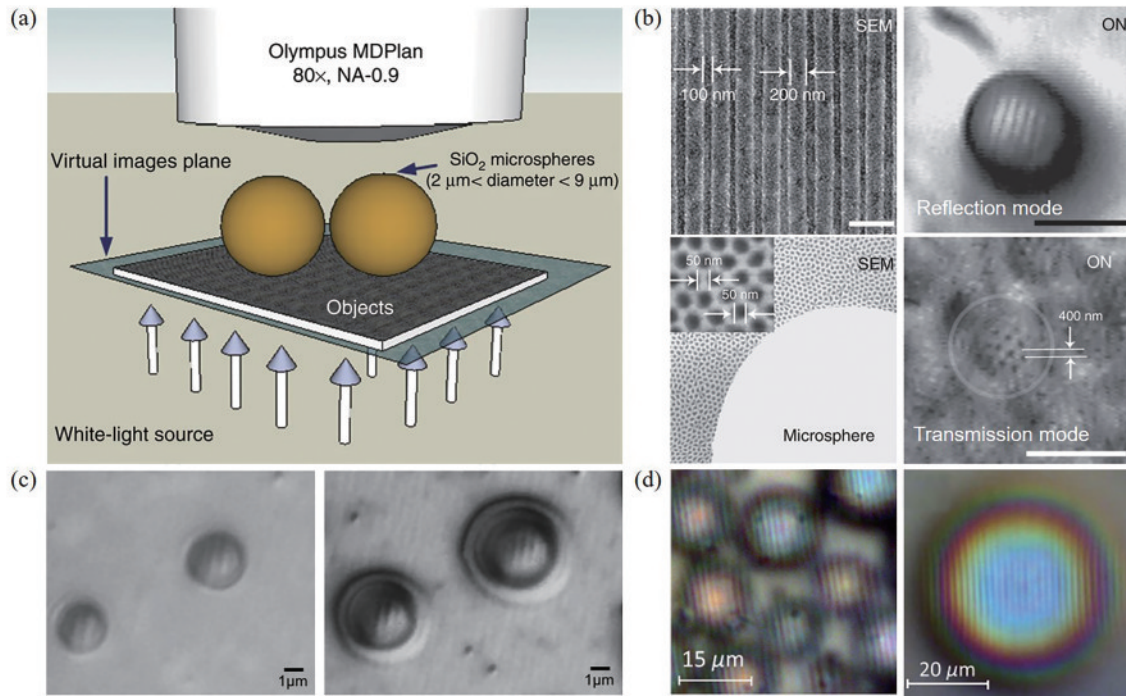


图 2 微球明场超分辨成像装置图及无浸没、半浸没、完全浸没结果图。(a)微球明场超分辨成像结构示意图^[19];(b)无浸液 SiO₂微球下,蓝光光盘表面结构(上)及阳极氧化铝样品(下)的扫描电子显微镜(SEM)图(左)和微球超分辨成像图(右)^[19];(c)蓝光光盘表面结构在无浸液 SiO₂微球(左)和乙醇半浸没 SiO₂微球(右)下的对比结果图^[24];(d)蓝光光盘表面结构在异丙醇完全浸没 BaTiO₃微球(左: $n=1.9$, $d \in [5 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}]$,右: $n=2.1$, $d=53 \mu\text{m}$)下的超分辨成像图^[25]

Fig. 2 Microsphere brightfield super-resolution imaging device and non-immersion, semi-immersion, and complete immersion results. (a) Schematic diagram of the structure of brightfield super-resolution imaging based on microspheres^[19]; (b) scanning electron microscope (SEM) of the surface structure of Blu-ray disc (top) and anodized aluminum sample (bottom) without immersion SiO₂ microspheres (left) and super-resolution imaging of microspheres (right)^[19]; (c) the comparison results of the surface structure of Blu-ray disc under the condition of non-immersion SiO₂ microspheres (left) and ethanol semi-immersed SiO₂ microspheres (right)^[24]; (d) super-resolution imaging of the surface structure of a Blu-ray disc under complete immersion of BaTiO₃ microspheres (left: $n=1.9$, $d \in [5 \mu\text{m}, 20 \mu\text{m}]$, right: $n=2.1$, $d=53 \mu\text{m}$) in isopropanol^[25]

40%蔗糖溶液(n 为 1.399)、显微镜浸油(n 为 1.518)完全浸没来对蓝光光盘表面结构成像,可以看出,条纹的对比度与放大程度是依次递减的^[26]。但是,两者之比也不能过大,过大时会导致入射光聚焦在微球内部,无法对外部样品进行成像。一般来说,两者之比应控制在小于 1.8^[27],以确保光聚焦在微球外部。同时,当微球折射率与环境折射率之比一定时,浸没在液体中的高折射率微球相比在空气中的低折射率微球,能够实现更清晰的聚焦和更高质量的成像,如图 3(c)所示^[28]。

此外,微球直径也是影响超分辨成像的重要因素。研究发现:当微球直径小于 10 μm 时,成像的放大倍数随直径的增加而增加,微球直径大于该尺寸后,成像的放大倍数便会随直径的增加而减小;成像的视野则几乎是随着微球直径增加线性增加的,如图 3(b)所示^[25]。因此,为兼顾放大倍数和成像视野,微球的直径尺寸需要谨慎选择。

另外,物镜参数^[29]、入射波长^[30]、成像样品^[31]等也是影响微球超分辨成像的参数。国内外研究团队对微球明场超分辨进行了大量研究,例如:在无荧光标记的

条件下,对 75 nm 腺病毒进行成像^[32];利用微球与激光扫描共聚焦显微镜结合,可在明场下实现达 25 nm 的横向分辨率^[33];利用细胞作为生物微球透镜,结合光纤和光镊,在白光显微镜下实现 $\lambda/5$ 的分辨率^[34]等。基于微球的明场超分辨成像技术方法简单、易于实现,且可与多种显微成像技术结合,具有广阔的发展前景。

3.2 基于微球的荧光超分辨成像

相比明场成像,荧光标记成像具有特异性强、灵敏度高、通道多等优点,在生物成像与医学检测等领域应用更为广泛。而微球不仅在明场下可实现超分辨成像,在荧光模式下也能实现超分辨成像。

2013年,瑞士洛桑联邦理工学院研究团队在传统显微镜中将折射率为 1.92 的 BaTiO₃微球与浸水物镜结合,实现了具有亚衍射特征尺寸的纳米结构超分辨成像^[35]。在水中进行的荧光成像实验表明,直径为 60 μm 的 BaTiO₃微球可将染料修饰的 1 μm 聚苯乙烯颗粒放大 5.4 倍,并对尺寸小至约 $\lambda/7$ 的纳米颗粒进行分辨,如图 4(a)所示^[35]。同时,他们证明了荧光标记的中心粒、线粒体、染色体等亚细胞结构都可通过微球

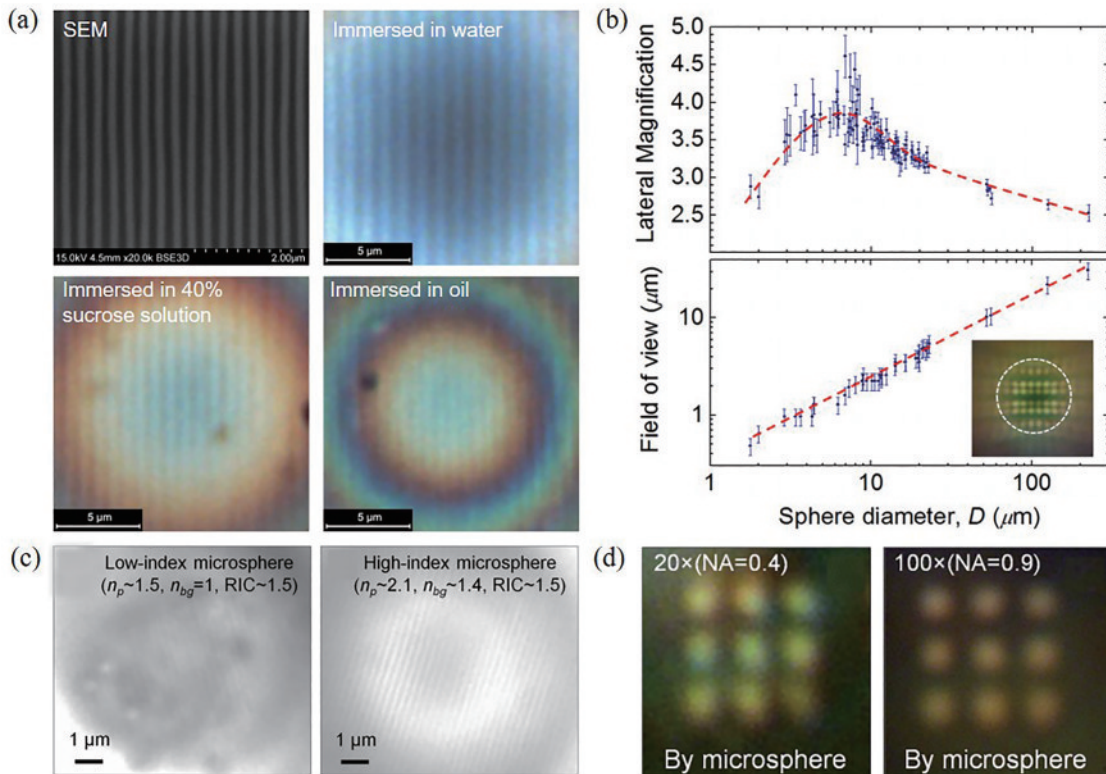


图3 影响微球成像的因素。(a)蓝光光盘表面结构的SEM图及BaTiO₃微球分别被水、40%蔗糖溶液、显微镜浸油完全浸没时对蓝光光盘表面结构成像结果图^[26]；(b)微球直径与成像放大倍数及成像视野之间的关系^[25]；(c)微球折射率与环境折射率之比为1.5时，在空气中的低折射率微球与浸没在液体中的高折射率微球对蓝光光盘表面结构的成像结果对比图^[28]；(d)微球通过不同参数的物镜对纳米等离子体结构成像结果对比^[29]

Fig. 3 Factors affecting microsphere imaging. (a) SEM image of the surface structure of a Blu-ray disc, and the image results of the surface structure of the Blu-ray disc when BaTiO₃ microspheres are completely immersed in water, 40% sucrose solution, and microscope oil respectively^[26]; (b) the relationship between the diameter of the microsphere and the imaging magnification, the imaging field of view^[25]; (c) comparison of imaging results of surface structure of the Blu-ray disc by low refractive index microspheres in air and high refractive index microspheres immersed in liquid when the ratio of refractive index of microspheres to environmental refractive index is the same as 1.5^[28]; (d) the comparison of the imaging results of the nanoplasma by the microsphere through the objective lens with different parameters^[29]

在传统显微镜下清晰分辨，突破了传统显微镜的衍射极限，实现了亚细胞结构的直接观察。然而，由于单个微球的成像视野有限，且微球与样品之间的距离不易精确定量控制，难以获得高质量、高对比度、大视野的超分辨成像。因此，中国科学院的科研人员利用原子力显微镜(AFM)的悬臂探针来操控微球，实现微球的定向移动并控制微球与样品之间的距离，获得了无接触、大范围、高速的超分辨荧光细胞成像，如图4(b)所示。与直接使用传统光学显微镜相比，有了BaTiO₃微球(d 为56 μm)的显微镜可以分辨出更精细的表面结构信息，这种方案不仅解除了微球成像视场受尺寸大小和边界区域像差的限制，还无须损伤细胞^[36]。另外，通过图4(b)的结果对比可以看出，微球不仅起到了提高分辨率的作用，同时还起到了增强荧光信号信噪比的作用。基于此原理，2021年江苏师范大学的研究团队借助于液体浸没的BaTiO₃微球(d 为150 μm, n 为

2.2)，在宽场显微镜下仅利用放大倍率为20×、数值孔径为0.4的空气物镜便实现了单量子点(QDs)的高质量荧光成像，其信噪比与放大倍率为100×、数值孔径为1.4的浸油物镜相当，如图4(c)所示^[22]。他们还利用放大倍率为20×、数值孔径为0.4的空气物镜结合BaTiO₃微球对前列腺特异性抗原进行了数字免疫分析，测量的血清数据与医院提供的值接近。这为实现显微镜小型化、降低系统成本提供了新方法，有利于生物分子数字分析的普及。

基于微球的荧光超分辨成像技术，可与其他超分辨成像技术相结合将分辨率进一步提高。2017年，来自美国加利福尼亚大学的研究者将微球与局部等离子体结构照明显微技术(LPSIM)结合，与传统光学显微镜相比，该显微技术实现了分辨率7~11倍的提高，且此技术的分辨率显著优于单独使用微球或单独使用LPSIM时的结果，如图4(d)所示^[37]。

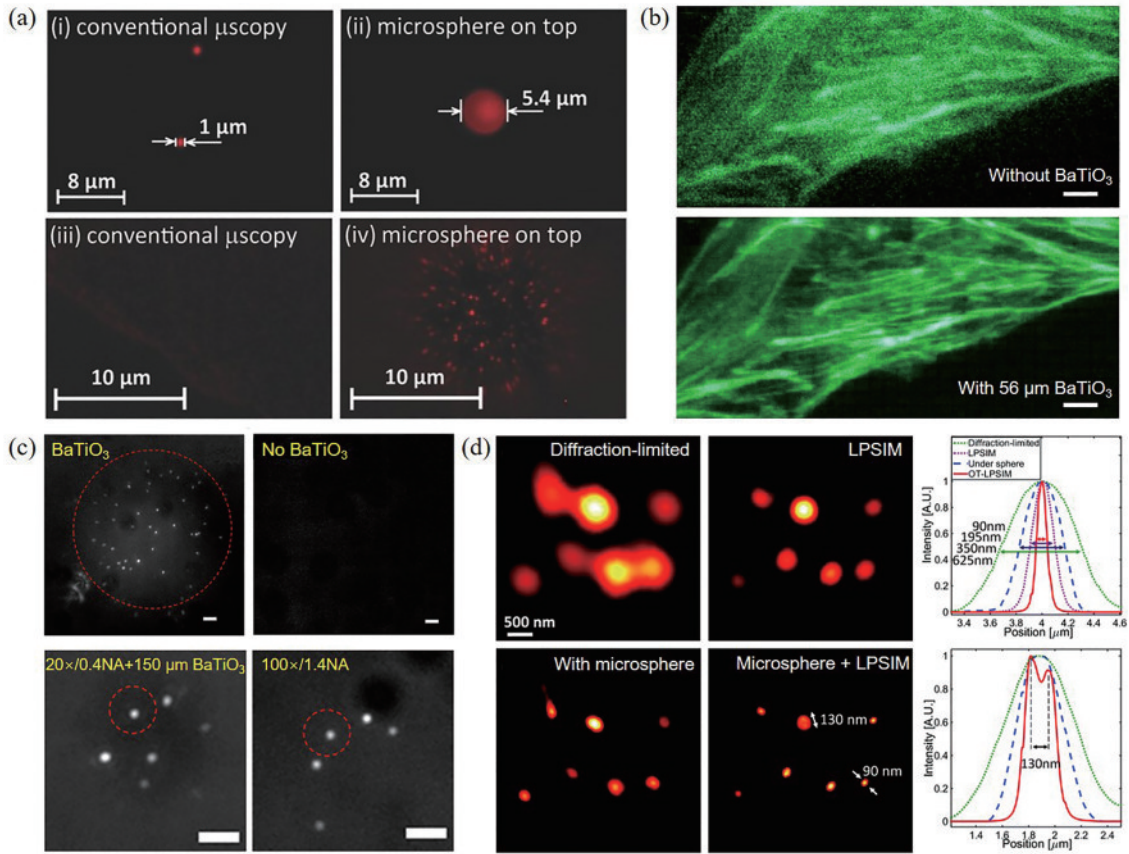


图 4 基于微球的荧光超分辨成像。(a)直径 60 μm 的 BaTiO₃微球可将荧光图像放大 5.4 倍,并分辨出 100 nm 的荧光颗粒^[35]; (b)直径 56 μm 的 BaTiO₃微球对小鼠成肌细胞(C2C12)无接触、大范围的荧光超分辨扫描成像^[36]; (c)在宽场显微镜下,有/无 BaTiO₃微球的荧光成像对比图及 20×、0.4 物镜结合 150 μm BaTiO₃微球与 100×、1.4 物镜的荧光成像对比图^[22]; (d) 40 nm 荧光珠分别在传统显微镜、微球、LPSIM、微球结合 LPSIM 下的成像结果图和定量分析的分辨率^[37]

Fig. 4 Fluorescence super-resolution imaging based on microspheres. (a) BaTiO₃ microspheres with the diameter of 60 μm can magnify the fluorescence image by a factor of 5.4 and resolve the fluorescent particles of 100 nm^[35]; (b) non-contact and large-scale fluorescence super-resolution scanning imaging of mouse myoblasts (C2C12) by BaTiO₃ microspheres with the diameter of 56 μm^[36]; (c) fluorescence imaging comparison with and without BaTiO₃ microspheres under widefield microscope and fluorescence imaging comparison of 20×, 0.4 objective combined with 150 μm BaTiO₃ microspheres and 100×, 1.4 objective^[22]; (d) the imaging results and the resolution of quantitative analysis of 40 nm fluorescent beads under traditional microscope, microspheres, LPSIM, and microspheres combined with LPSIM, respectively^[37]

3.3 基于微球的超分辨成像原理

关于微球超分辨成像的机理尚未有定论,目前主流观点主要认为其与虚拟成像、倏逝波传输、光子纳米射流等有关。

3.3.1 虚拟成像

在多数微球超分辨成像中,成像平面总是在样品平面下方^[38]。成像过程中,微球首先形成一个放大的虚拟图像,如图 5(a)所示,这个被放大的虚拟图像取代了原始样品作为传统光学显微镜的成像目标,因此,传统的光学显微镜就可以看到分辨率更好的图像。例如,原始样品最小特征尺寸是 100 nm,若微球将其放大了 4 倍,则所成的虚拟图像中的最小特征尺寸被放大大为 400 nm,而 400 nm 在衍射极限之上,能够被传统显微镜分辨。传统的显微镜不能观察到尺寸小于 200 nm 的物体,如果通过微球提供的额外放大倍数,

则可以清晰地观察到虚拟图像中 50 nm(200/4)的最小特征尺寸。进一步讲,若微球可将原始尺寸放大 10 倍,则理论上来说,通过微球有望分辨 20 nm(200/10)大小^[39]。

3.3.2 倏逝波传输

倏逝波是指传输局限于其最初产生的表面,振幅随着与表面垂直距离的增大呈指数形式衰减的波,具有局域性、非传导性和高频性特点。通常空域中的光学衍射极限,对应频域中的截止频率,这意味着高频信息会缺失,无法实现超分辨成像^[40]。然而,倏逝波的波数大于传导波,可以承载传导波无法携带的样品高频信息。微球则能够把样品近场的倏逝波信息耦合传导至远场,以此打破衍射极限,提高分辨率^[26,41-42]。

3.3.3 光子纳米射流

2004 年,美国研究团队指出微米级介电圆柱和微

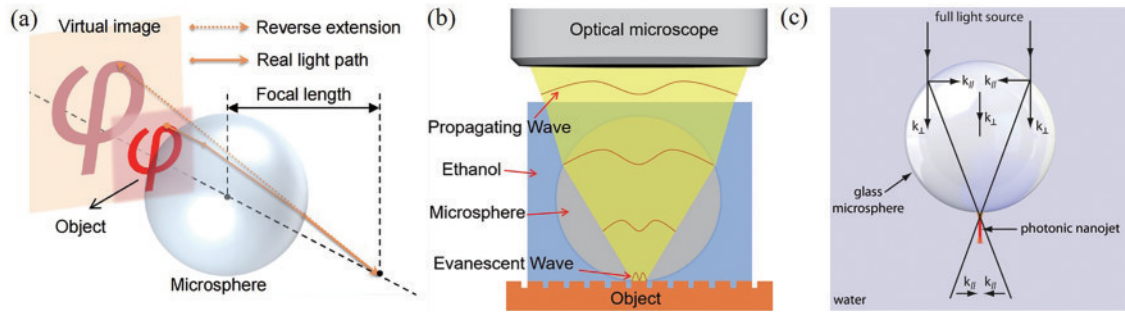


图 5 基于微球的超分辨成像原理。(a)虚拟成像理论^[39];(b)微球耦合倏逝波传输^[42];(c)光子纳米射流形成示意图^[44]

Fig. 5 Principle of super-resolution imaging based on microspheres. (a) Virtual imaging theory^[39]; (b) microsphere coupled evanescent wave transmission^[42]; (c) schematic diagram of photonic nanojet formation^[44]

球能够将入射平面波聚焦成一个超越光学衍射极限的小光斑,这种在微球/微柱背面形成较强局域光场及较窄光束宽度的现象被称为光子纳米射流,如图 5(c)所示^[43]。光子纳米射流的聚焦光束半峰全宽可小于经典衍射极限^[20],因此也在一定程度上解释了微球具备超分辨成像能力的原因。

4 基于微球的荧光增强

微球不仅能够提高光学成像分辨率上发挥重要作用,其在光场的聚焦与收集方面也为荧光增强提供了新策略。接下来将主要阐述基于微球/微球阵列的荧光增强现象、原理模型及影响因素等。

4.1 基于微球的荧光增强现象研究

4.1.1 单光子激发荧光的增强

在荧光发光过程中,当激发光子能量满足材料基态与激发态能级之差时,处于基态的荧光分子会吸收一个光子,跃迁到一个能量较高但不稳定的激发态,随后释放出一个光子,再回到基态,此为单光子荧光激发。这个过程中由于存在非辐射能量损失,发射出的光子能量总是要小于激发光子。

为提高荧光信号的信噪比,在单分子荧光检测中通常使用共聚焦显微镜,利用高数值孔径物镜来最大限度地收集信号并滤除杂散光。然而,高数值孔径物镜成像视野小,荧光检测效率低。虽有研究人员指出可利用微毛细管^[45]、微通道^[46]等技术来提高检测效率,但这些技术依赖昂贵的光学仪器和复杂的加工过程。2008年,法国菲涅耳研究院的研究团队将折射率为 1.6、直径为 2 μm 的微球用于增强单分子检测和荧光相关光谱(FCS)测量中,观察到单个 Alexa-Fluor 647 染料分子荧光亮度增强了 5 倍,且探测体积比衍射极限小了一个数量级,这有效提高了测量的信噪比^[47],其原因是微球通过聚焦方式能够实现高斯光束在各个方向上较强的电磁约束,使得沿光轴的光束范围大大减小,如图 6(b)所示,这不仅可将入射光的强度提升 2.2 倍,也可降低与激发体积成正比的背景噪声。另外,微球可将荧光分子发出的荧光重新定向到光轴上,

实现收集效率从 30% 到 66% 的提高。通过这两种效应的协同增强,荧光增强的倍数便能达到 5 倍^[48]。

发光器件中的荧光材料常会因为本身发光效率低或与其他材料的聚合造成量子效率降低等发光信号弱的问题,在实际应用中受到限制。虽说可以通过提高激发光强来增强荧光发光,但容易导致器件损伤,降低器件寿命。有研究者通过表面等离子体激元共振来增强荧光^[14-15],但基于表面等离子体激元的金属结构对环境因素敏感、制造工艺复杂,使得发光器件面临稳定性不高、扩展应用困难等问题。对此,北京工业大学研究团队提出一种基于微球阵列的、简便的、低损耗的、全光谱的荧光增强方案。2014年,他们通过在 ZnO 薄膜表面铺一层透明的微球阵列,得到了超过 10 倍的紫外荧光增强,如图 6(c)所示,该增强方案不仅可媲美主流的表面等离子体共振增强方案,而且对 ZnO 薄膜衬底无选择要求^[49]。此后,该团队对覆盖有微球阵列的 ZnO 薄膜紫外发光增强现象进行了深入研究,全面阐述了微球的聚焦效应、抗反射限光效应、光学回音壁模式谐振效应、定向天线效应以及 ZnO 薄膜衬底结构对荧光的增强作用^[50]。2019年,该团队又将单层高折射率微球阵列与半导体量子点柔性薄膜结构复合,首次实现了半导体量子点柔性薄膜超 3 个数量级的发光增强以及 RGB 三色混合白光量子点柔性薄膜的高效发光增强,如图 6(d)所示^[51]。这些工作为新一代紫外探测/发光器件、柔性发光/显示器件的开发提供了新的技术手段。

4.1.2 多光子激发荧光的增强

在照明光强充足的情况下,处于基态的荧光分子可能会同时吸收两个甚至多个光子,跃迁到激发态,随后释放出一个光子,再回到基态,此为多光子荧光激发。在多光子激发过程中,几个光子的能量总和匹配基态和激发态之间的能量差,且发射出的光子能量总是要高于单个激发光子。与传统单光子荧光相比,多光子激发的荧光量子效率往往较低,为实现可探测的多光子荧光通常需要高功率飞秒激光激发。但是,高光强飞秒激光往往对于材料的损伤较大,易导致荧光

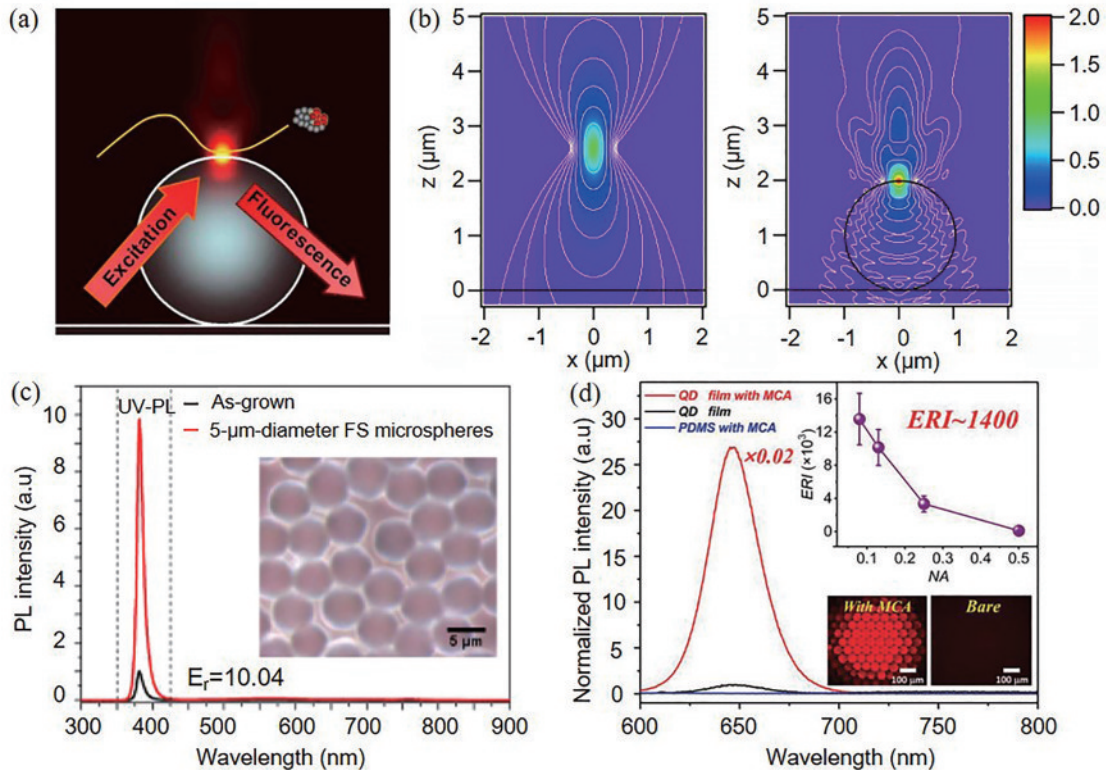


图 6 基于微球/微球阵列的单光子荧光增强。(a)微球用于单分子检测增强^[47];(b)有/没有微球时高斯光束的聚焦差异^[47];(c)单层熔融石英微球阵列置于 ZnO 薄膜表面得到紫外荧光增强^[49];(d)单层高折射率微球阵列与半导体量子点柔性薄膜复合结构增强荧光结果^[51]

Fig. 6 Single-photon fluorescence enhancement based on microspheres/microsphere arrays. (a) Microspheres for single-molecule detection enhancement^[47]; (b) the focusing difference of Gaussian beam with/without microspheres^[47]; (c) ultraviolet fluorescence enhancement of single layer fused silica microsphere array placed on the surface of ZnO film^[49]; (d) fluorescence enhancement results based on single-layer high-refractive-index microsphere arrays composited with semiconductor quantum dot flexible film structure^[51]

猝灭现象,且系统成本高昂。

2000年,美国陆军研究实验室的研究人员首次阐述了微球腔中多光子激发的荧光增强现象^[52]。2007年,法国 IPCMS 研究所报道了在 Rhodamine B 溶液中添加少量 SiO₂微球悬浮液,可实现约 35% 的双光子荧光增强,如图 7(a)所示^[53]。2018年,华中科技大学研究团队提出了一种由 SiO₂微球覆盖二维钙钛矿(PEA)薄片组成的复合介电结构,基于此结构,二维钙钛矿 2PbI₄ 的双光子荧光增强了 2 个数量级,如图 7(b)所示^[54]。

相比传统染料的多光子荧光效率,稀土掺杂上转换纳米颗粒(UCNPs)由于稀土离子的中间激发态能级和高激发态能级均为实能级,与传统染料常为虚能级需要同时吸收多个光子才能到达高激发态不同,因此 UCNPs 具有较高的多光子荧光量子效率。UCNPs 可利用近红外连续光激发,吸收两个或多个近红外低频光子后,辐射出一个高频光子,实现上转换可见光发光。它具有无光漂白、无光闪烁、窄带发射等优点,在生物传感、细胞成像等领域受到广泛关注^[58-59]。但由于其固有的多光子激发响应,相比传统单光子荧光,通

常需要激发光强度大于一定阈值才能实现可探测的上转换发光。2013年,西班牙的研究团队将微球用于上转换发光增强,将直径为 3.8 μm 的 SiO₂微球置于掺有 Er³⁺-Yb³⁺的玻片上,观察到 650 nm 处的红光发射增强了 3 倍,如图 7(c)所示^[55]。然而,分散的单个微球只能在极小区域内增强上转换发光。为扩大增强区域,2019年,新加坡国立大学研究人员将折射率为 1.4、直径为 20 μm 的聚合物微球阵列置于嵌有 UCNPs 的 PDMS 薄膜之上,实验装置如图 7(d)所示。在 1.5 W/cm² 功率的 980 nm 激光激发下,该方法实现了对 NaGdF₄:Yb/Tm@NaGdF₄:Eu 材料在 614 nm 处上转换发光高达 5 个数量级的增强。图 7(e)为含有 UCNPs 的 PDMS 薄膜的上转换发光图像,从图中可以直观看出,被微球阵列覆盖的区域显示出明亮的可见光发射,而在没有微球的情况下,只捕捉到不明显的发光^[56]。同年,来自瑞典皇家理工学院的研究者选取了被切割的半微球阵列实现了大面积高倍数的荧光增强,利用高度为 16.47 μm、宽度为 47.08 μm、周期为 51.02 μm 的半微球阵列,在 0.2 W/cm² 的 808 nm 连续光低功率激发下,该工作实现了 NaYF₄:20%Yb³⁺,0.5%Tm³⁺@

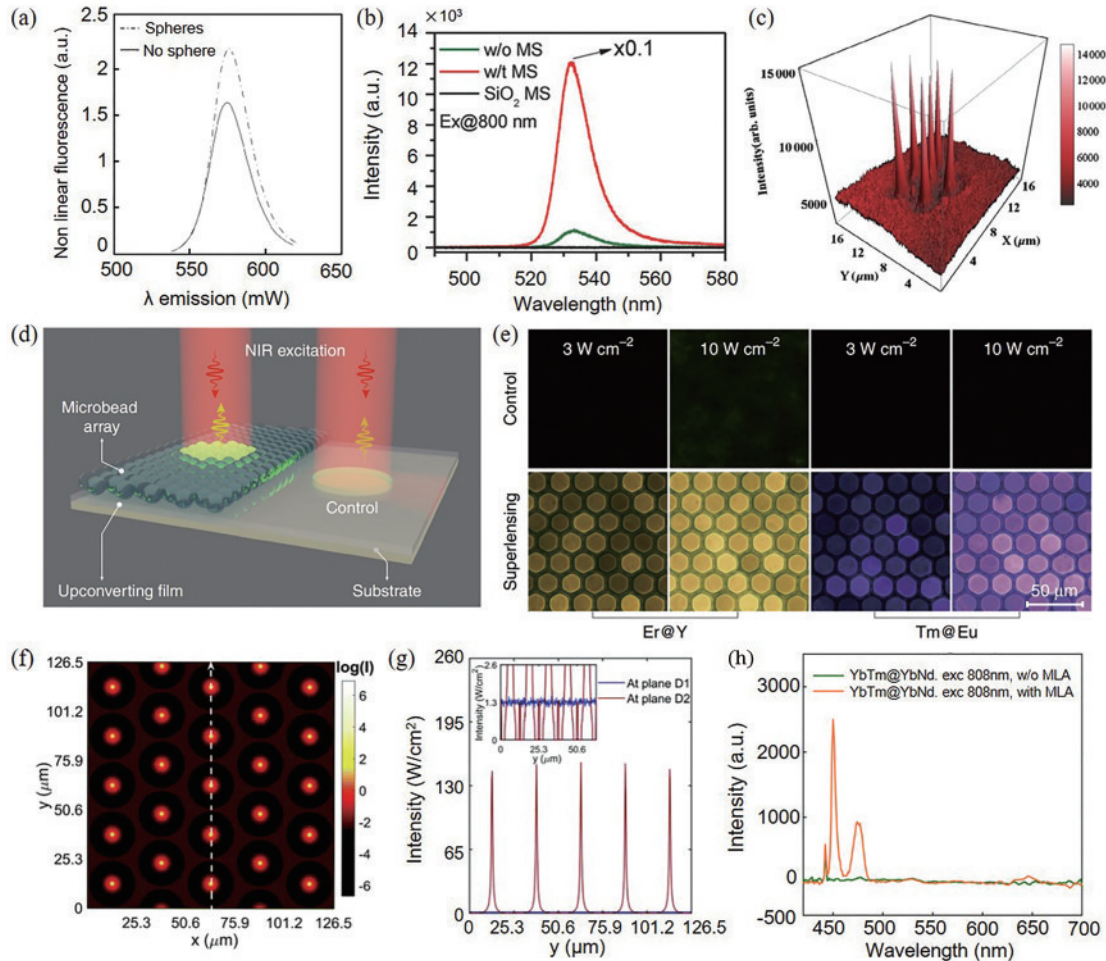


图 7 基于微球的多光子荧光增强。(a) SiO₂微球增强 Rhodamine B 发光 30% 示意图^[53]; (b) SiO₂微球增强二维钙钛矿发光 110 倍示意图^[54]; (c) SiO₂微球增强上转换发光 3 倍示意图^[55]; (d) 微球阵列增强上转换发光的实验装置示意图^[56]; (e) 不同强度的激发光下, 有/没有微球阵列覆盖的上转换发光对比图^[56]; (f) 激发光经过半微球阵列后的强度分布模拟仿真图^[57]; (g) 激发光经过半微球阵列前 (蓝线)、后 (红线) 沿选定线的强度分布图^[57]; (h) 有/没有半微球阵列的上转换发光光谱图^[57]

Fig. 7 Multiphoton fluorescence enhancement based on microspheres. (a) Schematic diagram of 30% luminescence enhancement of Rhodamine B by SiO₂ microspheres^[53]; (b) schematic diagram of 110 times luminescence of two-dimensional perovskite enhanced by SiO₂ microspheres^[54]; (c) schematic diagram of 3 times of upconversion luminescence enhanced by SiO₂ microspheres^[55]; (d) schematic diagram of experimental device for microsphere arrays enhancing upconversion luminescence^[56]; (e) upconversion luminescence comparison diagram with/without microsphere arrays under different intensities of excitation light^[56]; (f) simulation diagram of the intensity distribution of the excitation light after passing through the half-microsphere arrays^[57]; (g) the intensity distribution of excitation light along the selected line before (blue line) and after (red line) passing through the half-microsphere arrays^[57]; (h) the upconversion luminescence spectra with/without half-microsphere arrays^[57]

20%Yb³⁺, 30%Nd³⁺ 材料 450 nm 处上转换发光约 225 倍的增强^[57]。从图 7(f)、(g) 可以看出, 每个半微球都可以将激发光聚焦到中心, 经过半微球聚焦后的激发光明显高于经过半微球前的光强^[57]。值得注意的是, 同样是微球对上转换发光的增强, 但是 3 个团队获得的增强倍数都不相同, 可以发现他们的实验条件如微球的形状、直径、微球内外折射率、荧光发射机理、激发光光强均不相同, 甚至样品的制备、样品与微球的结构组合差异也会造成影响。

4.1.3 微球与表面等离激元共振结合增强荧光发光

荧光增强常通过金属表面等离激元共振来实

现, 而微球增强荧光发光机理与其不尽相同。通过结合微球调控光场的优势和金属表面等离激元共振效应, 构建微球/金属纳米颗粒/发光材料的复合结构是进一步增强荧光材料发光的有效途径。

2019 年, 北京工业大学研究团队提出了微球阵列/Al/ZnO 薄膜/Au/基底复合结构, 使得 ZnO 薄膜的发光强度增强了 2 个数量级, 远远高于单独使用微球阵列增强或金属表面等离激元共振增强的效果^[60]。2020 年, 来自中山大学的研究者们提出了一种由三聚氰胺-甲醛(MF)微球覆盖金纳米棒(AuNR)膜 (简称 MS/AuNR) 组成的混合结构, 以量子点作为荧

光材料, 荧光最大增强幅度可达 260 倍, 如图 8(a)、(b) 所示。同时, 该混合结构用于荧光成像实现了 100 nm 的超分辨成像^[61]。同年, 吉林大学与瑞典皇家理工学院合作团队提出基于半微球阵列和贵金属局域表面等

离子体激元共振的级联放大策略, 使得上转换发光增强了 4 个数量级, 如图 8(c)、(d) 所示, 并将增强后的上转换纳米颗粒与钙钛矿薄膜结合, 为研制近红外光电探测器提供了新思路和新策略^[62]。

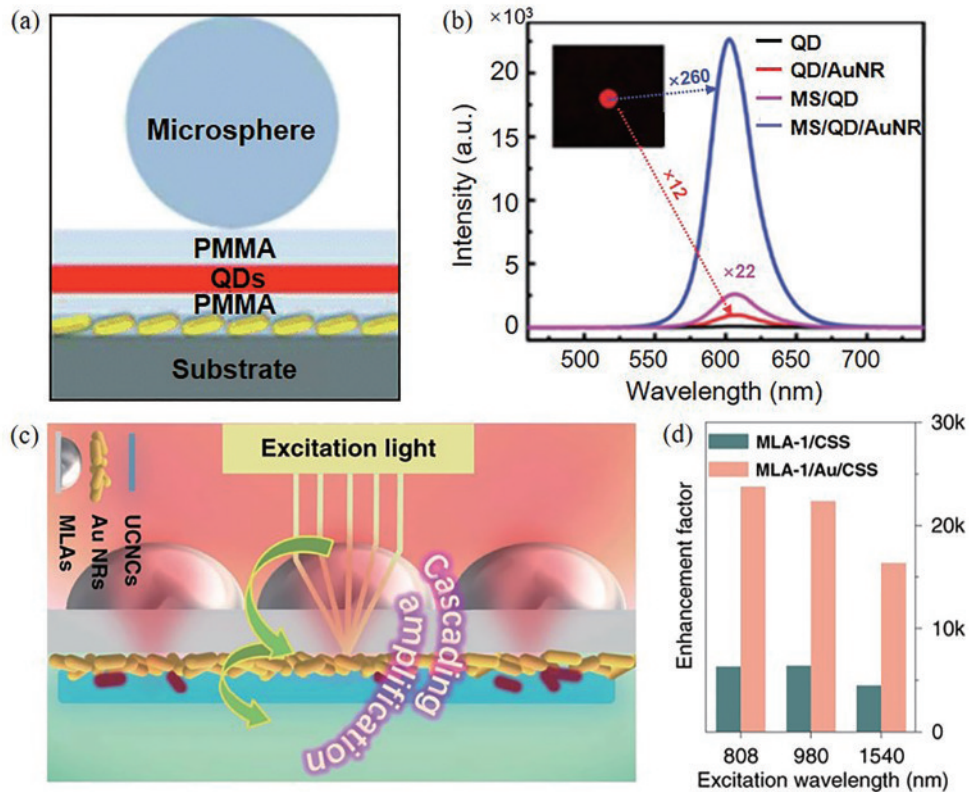


图 8 微球与表面等离子体激元共振结合增强荧光发光示意图。(a)(b)微球/金纳米棒混合结构对量子点发光增强示意图^[61];

(c)(d)半微球阵列/金纳米棒复合结构增强上转换发光示意图^[62]

Fig. 8 Schematic diagrams of enhanced fluorescence of microsphere combined with surface plasmon resonance. (a)(b) Schematic diagrams of luminescence enhancement of quantum dots by hybrid structure of microspheres/gold nanorods^[61]; (c)(d) schematic diagrams of enhanced upconversion luminescence of semi microsphere array/gold nanorod composite structure^[62]

4.1.4 天然生物微球增强荧光发光

传统微球制备繁琐, 且在生物成像、检测及传感应用中须与生物样品相互作用, 但生物相容性较低。幸运的是, 在生物体内也存在一些天然微球可实现类似的荧光增强效果。暨南大学的科研人员在 2017 年证明了球形酵母细胞可以充当天然生物微球, 其可用于增强 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 上转换纳米颗粒发光, 增强倍数超过 2 个数量级, 如图 9(a)、(b) 所示。并且, 利用增强的上转换荧光, 还实现了单细胞成像和实时病原菌检测^[63]。有了球形酵母细胞可以充当天然生物微球的启示, 2021 年该团队又利用成熟脂肪细胞内的球形内源性脂滴作为完全生物相容的微球, 实现了活细胞内细胞骨架、溶酶体和腺病毒的荧光增强及实时成像, 如图 9(c)~(e) 所示。同时, 由于脂滴对入射光的聚焦作用, 其也可实现对细胞外液中癌细胞荧光信号的有效检测^[64]。相比传统微球, 天然生物微球还有另一个优势就是可以实现变焦, 该团队报道了细胞内的叶绿体可作为天然微透镜实现荧光增强及荧光成像, 同时指

出利用光镊产生的力可操纵改变叶绿体微透镜形状, 从而实现微透镜焦距调节, 如图 9(f)、(g) 所示。他们利用直径为 $9\ \mu\text{m}$ 的球形叶绿体和长、短轴分别为 $9.6\ \mu\text{m}$ 的椭球形叶绿体分别实现了量子点 2.5 和 2 倍的荧光信号增强^[65]。这些天然微球为多功能生物传感、内窥镜成像和单细胞诊断的生物相容性光学工具开辟了新途径。

4.2 基于微球的荧光增强原理模型

微球为增强荧光发光提供了新的技术手段, 但其增强机理尚未完全清楚, 研究者主要从以下几个方面进行了微球增强荧光的相关机理解释。

4.2.1 聚焦入射光强

微球具有出色的聚焦特性^[44,56,64]。当光波入射时, 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, 且在这个微小的区域内, 聚焦光强得到极大提高, 远远超过入射光场强度, 如图 10(a) 所示。

光子纳米射流是用来解释微球聚焦特性最多的模型^[21,53,66]。光子纳米射流的光场强度相比入射光场强

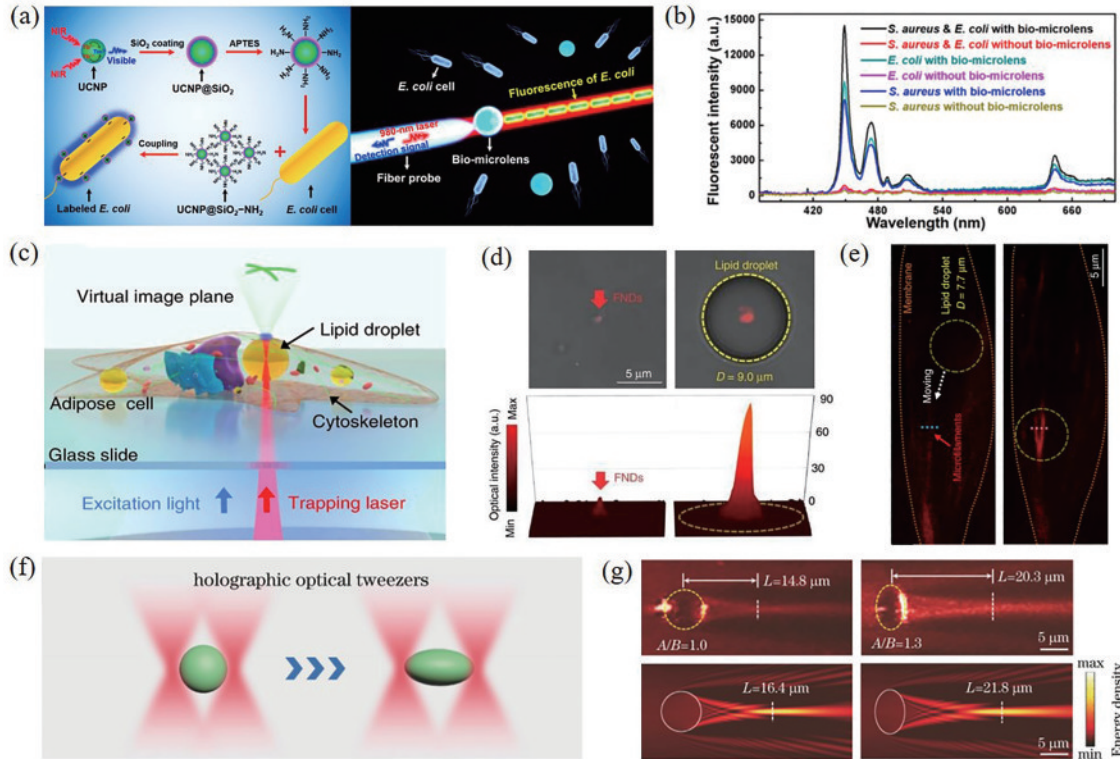


图9 生物微球增强荧光发光示例。(a)用上转换纳米颗粒标记细菌及生物微球增强上转换发光示意图^[63]；(b)球形酵母细胞增强上转换发光示意图^[63]；(c)成熟脂肪细胞内的球形内源性脂滴聚焦激发光并收集荧光信号形成放大荧光图像示意图^[64]；(d)(e)脂滴在活细胞内增强荧光以及对细胞骨架进行荧光成像示意图^[64]；(f)细胞内的叶绿体被光镊拉伸实现焦距调节示意图^[65]；(g)球形或椭球形叶绿体聚焦光场实验图与模拟图^[65]

Fig. 9 Examples of biological microspheres enhanced fluorescence. (a) Schematic diagram of bacteria labeled with upconversion nanoparticles and biological microsphere enhance upconversion luminescence^[63]; (b) schematic diagram of enhanced upconversion luminescence by spherical yeast cells^[63]; (c) schematic illustration of spherical endogenous lipid droplets in mature adipocytes focusing excitation light and collecting fluorescence signals to form magnified fluorescence images^[64]; (d) (e) diagram of lipid droplets enhancing fluorescence in living cells and fluorescence imaging of cytoskeleton^[64]; (f) schematic diagram of focal length adjustment by stretching chloroplasts in cells with optical tweezers^[65]; (g) experimental and simulation results of light field distribution of spherical or ellipsoidal chloroplast^[65]

度增强了几个数量级,且这种集中的光通量可以沿着倏逝场区域以外的路径传播几个波长而没有任何明显的发散。

作者利用时域有限差分法进行了光子纳米射流的3D模拟,设置入射光为波长为850 nm的平面波,微球折射率为2.2,外界背景折射率为1.4,微球直径为20 μm,结果如图10(a)所示,经过微球聚焦的光场最大强度相比入射光场强度增大超过1200倍,光强最大值到沿光轴方向衰减到 $1/e^2$ 处的距离(即光子纳米射流的喷射长度)约为1900 nm,微球边界到聚焦强度最大值的距离约为700 nm,这表明增强区域与微球边界具有一定距离。

4.2.2 提高量子效率

当光以足够大的入射角从光密介质向光疏介质传播时,可以在两种介质表面发生全反射,在闭合腔体的边界内,光可以一直被锁定在腔体内部保持稳定的行波传输模式,且损耗很低,这就是“回音壁模式

(WGM)”,如图10(b)所示。在WGM中,光波在1个准二维平面内运动,并且在垂直于光场平面的方向存在束缚,绝大部分能量不会在第3个维度发散。因此,WGM具有很高的品质因子和能量密度,可以极大地增强光与物质的相互作用^[67-68]。

当经微球聚焦的光到达荧光材料表面时,一部分会被荧光材料散射出去,另一部分会被荧光材料吸收从而引起自发辐射。散射光子会被薄膜表面的微球重新收集,并激发WGM。被微球捕获的散射激发光在接触点与荧光材料再发生相互作用,可以增强总的荧光发光强度。同时,微球通过WGM谐振引起微球-荧光材料耦合光场调控,即Purcell效应,实现荧光材料的自发辐射增强,从而使荧光内量子效率得到提升^[50-51]。

4.2.3 信号收集效率高

微球不仅具有光聚焦特性,还具有优异的集光效应,荧光信号经微球作用后具有很强的方向性,在探测

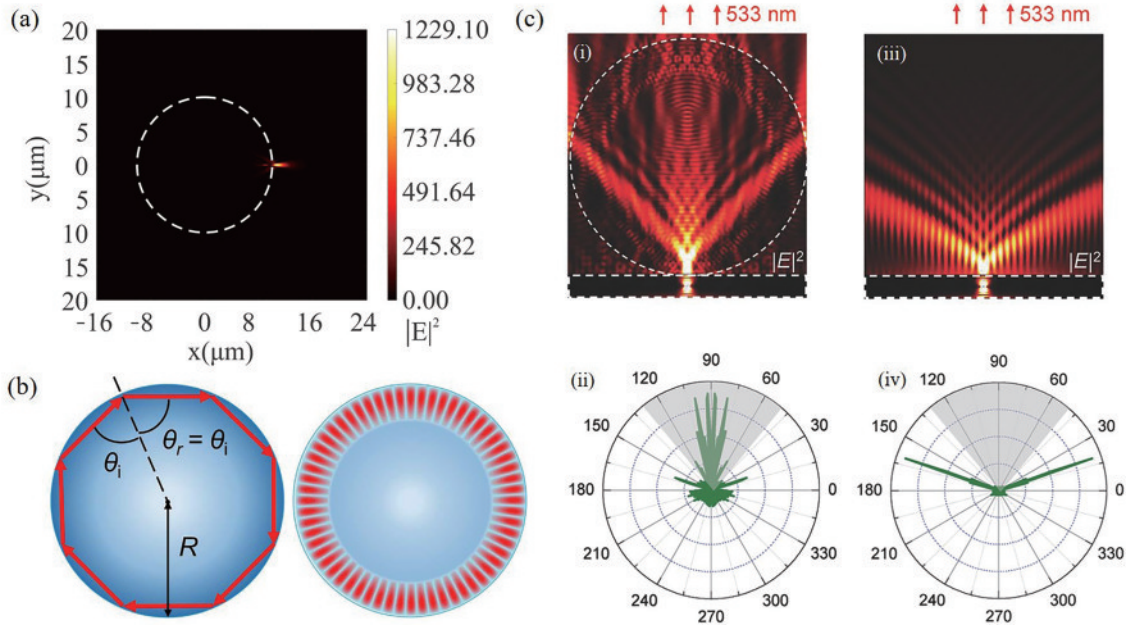


图 10 基于微球的荧光增强原理模型。(a)作者仿真的光子纳米射流聚焦入射光强度图；(b)回音壁模式提高量子效率示意图^[66]；

(c)微球提高荧光信号收集效率示意图^[54]

Fig. 10 Principle model of fluorescence enhancement based on microspheres. (a) Focusing incident light intensity diagram of photon nanojets simulated by the author; (b) schematic diagram of improving quantum efficiency by whispering gallery mode^[66]; (c) schematic diagram of microspheres improving fluorescence signal collection efficiency^[54]

过程中能够有效提高荧光信号的收集效率^[49,69]。

华中科技大学的研究人员将收集效率定义为物镜收集到的能量与辐射的总能量之比,模拟计算结果显示:有微球时,荧光信号在一个小角度里面被收集,微球/二维钙钛矿复合介电结构的收集效率为41%,如图10(c)(i)、(ii)所示;无微球时,荧光信号被散射到发散角很大的自由空间,大部分信号光的发散角大于物镜探测角,二维钙钛矿双光子荧光的收集效率只有9.5%,如图10(c)(iii)、(iv)所示^[54]。新加坡国立大学的研究人员通过模拟仿真发现,点光源的波前通过微球后可以有效地转换为平面波,并且发散的上转换发射光场被很好地准直到远场。经计算得知:在发散半角约为17°和数值孔径为0.3时,微球使上转换发光收集效率提高了大约8倍;同时,通过研究Yb³⁺和Rhodamine B的下转换发光,也得到了相同恒定的值为8的增强因子^[56]。

4.3 基于微球的荧光增强影响因素

上述各团队研究工作中微球增强荧光的倍数各不相同,甚至有的相差几个量级,其主要影响因素包括微球直径、微球折射率、微球周围环境折射率、荧光发光机理、激发光波长及激发光光强等。通过研究这些因素将更加有利于明晰微球对荧光增强的量效关系。

4.3.1 微球直径

微球对荧光的增强作用与微球直径密不可分,一般来说,微球直径小于某一值时,荧光增强倍数会随着微球直径的增加而增强^[51,61]。

为了进一步验证微球直径对荧光增强的影响,作

者也利用时域有限差分法对不同尺寸微球进行了2D光场增强模拟,设置入射光为波长为850 nm的平面波,微球折射率为2.2,外界背景折射率为1.4,微球直径变化范围为2.5~20 μm。仿真结果显示,入射光通过微球聚焦后,强度最大值是随着微球直径增大而增大的,如图11(a)~(g)所示,这主要是因为随着微球直径的增加,收集入射光的面积也随之增大,从而引起聚焦强度变大。同时,还计算了微球聚焦光斑的功率密度随微球直径的变化关系,如图11(h)所示。可以看出,微球聚焦光场的最大功率密度随着微球直径的增加而增加,设入射平面波的功率密度 P_i 为1 mW/cm²,则经过微球后,聚焦光场的功率密度 $P = P_i \pi r_s^2 / \pi r_a^2$, r_s 为微球的半径, r_a 为聚焦光斑的半径。此外,还考虑了光子纳米射流的聚焦光斑横/纵方向上的半高宽与微球直径的具体关系,具体如图11(i)所示。

4.3.2 激发光光强

有研究表明,基于微球的荧光增强效应会随着激发光强度的增加而增加^[53],但也有一些研究发现,基于微球的荧光增强会随着激发光强度的增加而下降^[56-57]。比如,上转换纳米颗粒NaYF₄:20%Yb³⁺,0.5%Tm³⁺@20%Yb³⁺,30%Nd³⁺在808 nm激发下、450 nm发射处,基于微球的上转换发光增强因子在0.2 W/cm²的低激发强度下可达约225,而在激发强度增大至22.3 W/cm²时,增强因子降低到4.5,如图12(b)所示。这可能与发光材料自身性质及是否达到激发饱和有关。经过微球聚焦的激发光强度未达到饱和阈值前,荧光增强因子随着激发光强度增强而增

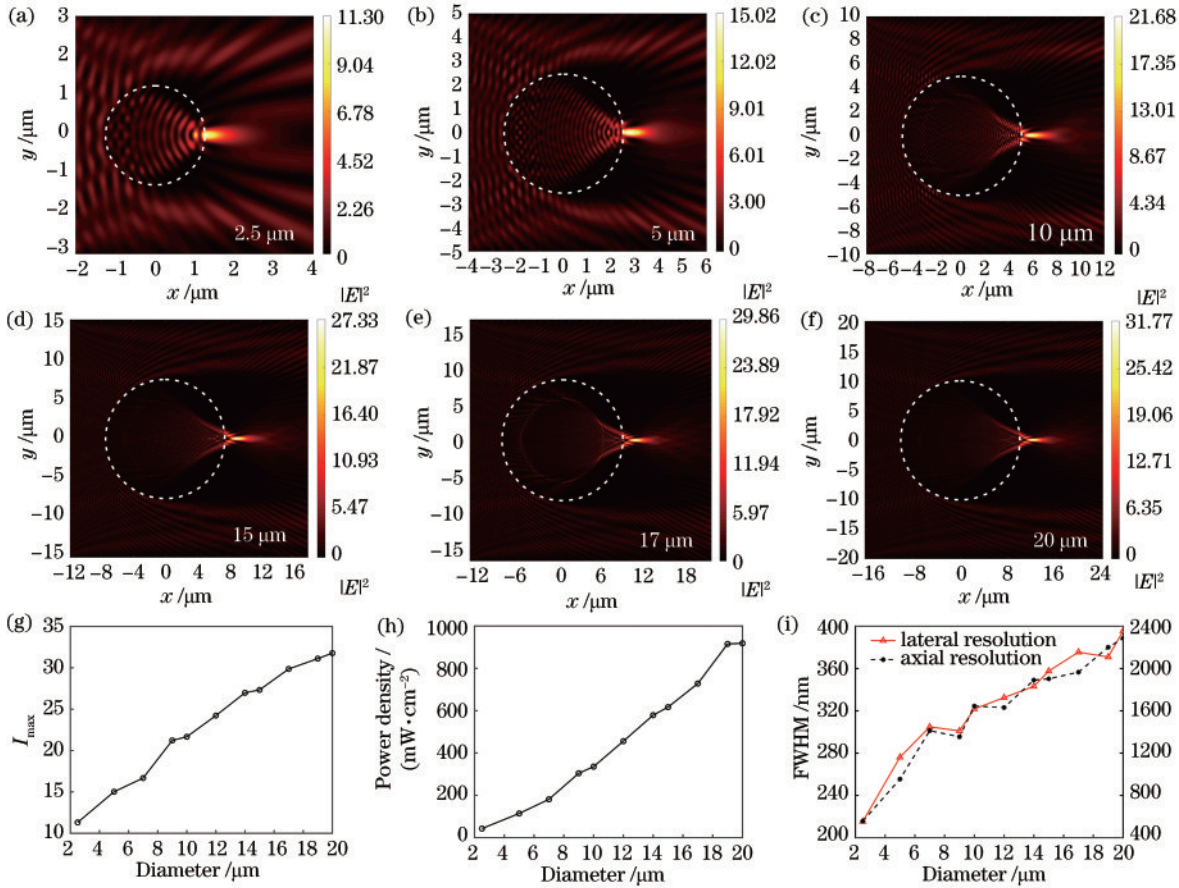


图 11 2D 仿真研究微球直径对光场增强影响的仿真图。(a)~(f)聚焦效果图;(g)~(i)最大聚焦光强度与微球直径关系图、聚焦光的最大功率密度随着微球直径变化关系图和聚焦光束横、纵方向上半高宽随着微球直径变化关系图

Fig. 11 2D simulation results of the influence of microsphere diameter on light field enhancement. (a)–(f) Focusing effect diagrams; (g)–(i) the relationship between the maximum focused light intensity and the diameter of the microsphere, the relationship between the maximum power density of the focused light and the diameter of the microsphere, and the relationship between full width at half maxima and the diameter of the microsphere in the horizontal and vertical directions of the focused beam

强,当经过微球聚焦的激发光强度达到饱和阈值后,荧光增强因子则会开始随着激发光强度的增强而呈现减弱趋势^[54,70],如图 12(a)所示。在微球增强上转换发光中,可能是因为上转换的多光子发光饱和阈值较低,在微球的聚焦作用下,到达材料的激发光功率已经超过饱和阈值,因此从一开始荧光增强因子就是随着激发光强度的增加而下降的。

4.3.3 荧光激发机理

由于荧光激发机理存在差异性,微球在增强荧光发光时,增强效果也会有所不同。美国陆军研究实验室的研究人员证明了基于微球的荧光增强因子会随着多光子激发过程中吸收光子数的增加而增大。例如,其他条件保持不变时,香豆素 510 染料单光子、双光子和三光子激发的荧光增强因子分别为 1.8、5 和 9^[52]。

上转换纳米颗粒发光存在双光子、三光子、四光子等发光过程,新加坡国立大学的研究人员在研究微球增强上转换纳米发光时提到,在微球尺寸、折射率、激发光光强等条件相同时,不同的上转换纳米颗粒或同

一上转换纳米颗粒的不同发光波长荧光增强倍数是不同的。在 $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ 的 980 nm 激发光下, $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}/\text{Tm}@/\text{NaGdF}_4:\text{Eu}$ 在 614 nm 处的发光增强达到 103000 倍,而 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}@/\text{NaYF}_4$ 在 540 nm 处的发光增强只有约 100 倍,如图 12(c)所示。他们认为引起这种差异的主要原因就是上转换荧光激发机理不同, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}@/\text{NaYF}_4$ 在 540 nm 处的发光仅为双光子发光,而 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}/\text{Tm}@/\text{NaGdF}_4:\text{Eu}$ 在 614 nm 处的发光为五光子发光,后者表现出更高的激发通量灵敏度,因此增强因子更大^[56]。

4.3.4 微球折射率与环境折射率比值

微球的折射率与外界环境的折射率差异也会影响荧光增强效果,法国菲涅耳研究院的研究团队发现,在相同的外界条件下,折射率为 1.68 的三聚氰胺微球能够提供比折射率为 1.59 的乳胶微球更好的荧光增强性能^[71]。另有研究表明,当微球自身折射率(n_p)和外界折射率(n_m)的比值 n_p/n_m 小于 1.6 时,微球聚焦强度随着比值的增加而增大,而当 n_p/n_m 大于 1.6 时,微球

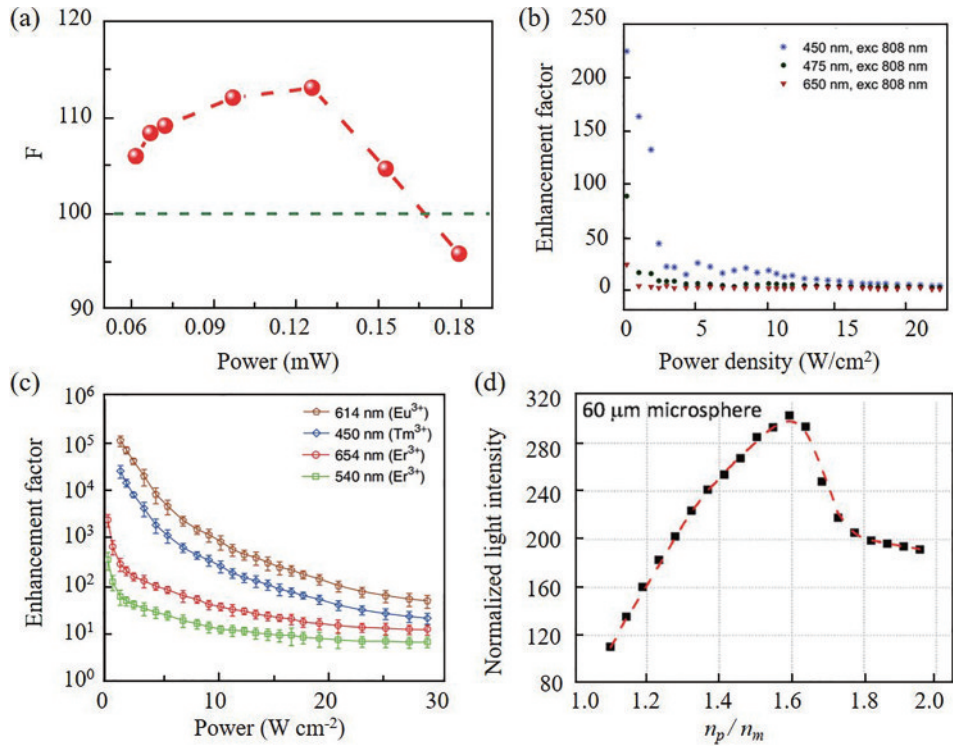


图 12 微球增强荧光发光的影响因素。(a) 荧光增强因子随激发光光强增加先增大后减小示例^[54]；(b) 荧光增强因子随激发光光强增加而减小示例^[57]；(c) 荧光激发机理^[56]；(d) 微球折射率与环境折射率差异^[35]

Fig. 12 Factors of fluorescence enhancement based on microsphere. (a) Example of the fluorescence enhancement factor first increasing and then decreasing with the increase of excitation light intensity^[54]; (b) example of the fluorescence enhancement factor decreasing with the increase of excitation light intensity^[57]; (c) the fluorescence excitation mechanism^[56]; (d) the difference between the refractive index of the microsphere and the environment^[35]

聚焦强度随着比值的增加而减小, 如图 12(d) 所示^[35]。作者进行了 2D 模拟, 设置入射光为波长为 850 nm 的

平面波, 微球直径为 5 μm, 微球折射率为 2.2, 外界背景折射率变化范围为 1.1~1.8, 结果如图 13 所示, 总

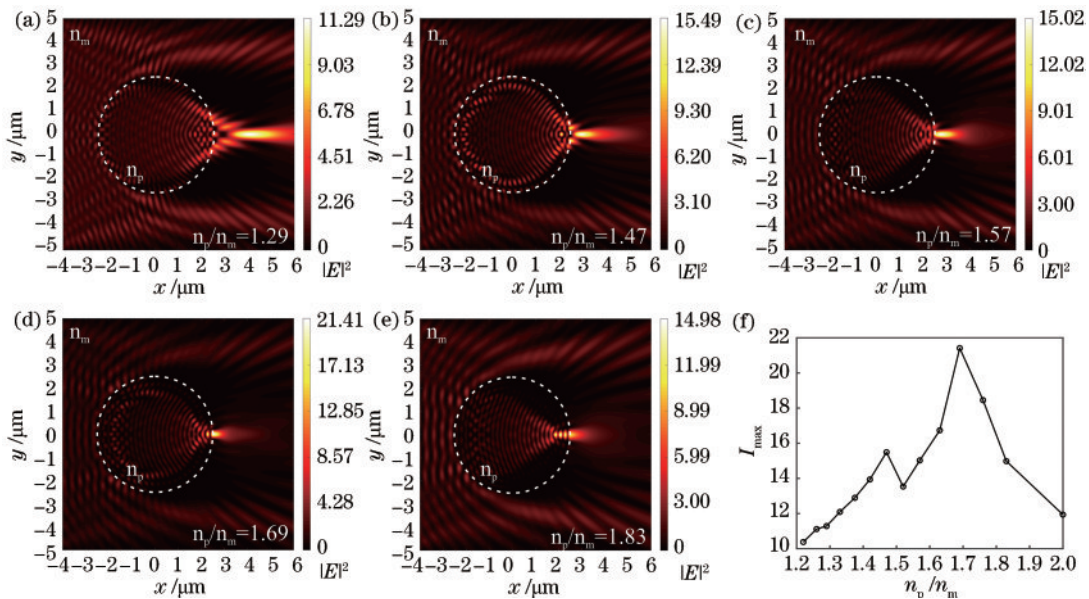


图 13 2D 仿真研究微球折射率与环境折射率比值对光场增强影响的仿真图。(a)~(e) 聚焦效果图；(f) 聚焦光强度与微球内外折射率关系图

Fig. 13 2D simulation results of the influence of the ratio of microsphere refractive index to environmental refractive index on the optical field enhancement. (a)~(e) Focusing effect diagrams; (f) relation between the focusing light intensity and the refractive index inside and outside the microspheres

体来说,随着折射率比值的增大,微球聚焦强度先增大后减小。

4.3.5 微球与样品的距离

普通的光学会聚透镜都存在一个焦点,经过透镜的光线会聚在此焦点处,因而焦点处的光线聚焦强度最大。微球也相当于一个微透镜,可以对入射光起到会聚作用。同理,入射光经微球后,会在某个点处聚焦强度达到最大。因此,当样品正处于微球聚焦最大值处,对样品的激发光强度也能达到最大,荧光发射强度也会相应增强。前面提到的 3 个团队利用微球增强上转换发光,但增强倍数均不同,除了以上讨论的几点影

响因素外,微球与样品间距离也是一个可能原因。因为新加坡国立大学团队的制样方法与其他两个不同,其他两个直接将微球/微球阵列铺在单层 UCNP 表面,无法确定或更改微球与样品间的距离,而前者将 UCNP 分散在 PDMS 的各个深度层中,这就使得将发光材料置于微球聚焦最大值处成为可能。将微球中心与聚焦强度最大值处的距离定义为微球的焦距,记为 f ,作者通过时域有限差分法 2D 仿真研究发现,微球最强的聚焦位置会随着微球直径、微球内外环境折射率差等因素改变,具体如图 14 所示。由此可见,在实验中可以通过控制微球与样品间的距离来优化增强效果。

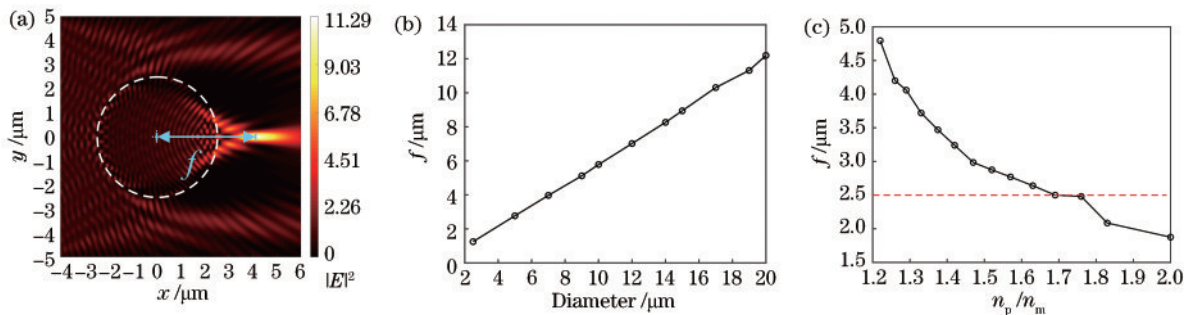


图 14 2D 仿真研究微球聚焦距离时的仿真图。(a) 微球聚焦距离示意图; (b) 微球直径对微球聚焦位置的影响; (c) 微球内外环境折射率之比对微球聚焦位置的影响, 红色虚线处为微球边界

Fig. 14 2D simulation diagrams of focusing distance of microspheres. (a) Schematic diagram of the focal distance of the microsphere; (b) the effect of the diameter of the microsphere on the focal position of the microsphere; (c) the influence of the ratio of the refractive indices of the inner and outer environments of the microsphere on the focal position of the microsphere, the red dotted line is the boundary of the microsphere

5 总结与展望

微球以一种简单、直接、高效的方式,为调控纳米光子学、生物光子学中光与物质相互作用提供了手段。得益于微球出色的光场调制能力,微球在超分辨成像、荧光增强等领域起到了重要作用。但在这个快速发展的领域中还有诸多问题需要进一步探究,如微球超分辨成像的分辨率量化问题。微球超分辨成像不同于传统超分辨成像,不可直接量化分辨率。微球会将样品结构成一个放大的像,由于像被放大,半峰全宽也随之被放大,因此简单利用点扩散函数半峰全宽来判断微球成像分辨率也不再适用。目前多数研究认为分辨出了已知样品上多大的结构,分辨率即可达到多少,但这并不能说明微球的极限分辨率。且在微球荧光超分辨成像中,当单个颗粒的尺寸远小于衍射极限时,很难准确判断是单个颗粒发光还是团聚在一起的颗粒发光。此外,微球超分辨成像及荧光增强的确切机理有待研究。研究人员已经在不同方面对基于微球的超分辨成像和荧光增强机制进行了研究和讨论,但至今仍缺乏完整的理论解释,研究者们提出的光子纳米射流、回音壁模式共振等暗示了微球复杂却又极富吸引力的机制。因此,探索出一套具有普适性、能预测各种材料实

验结果的理论机制具有重要的学术价值,也是当前该领域的重大挑战。

此外,微球方法在超分辨成像及荧光增强等应用方面也存在一定的局限性,如微球需要接触样品表面或是需要外界有浸液才能获得好的效果,这可能会造成样品污染。通过原子力显微镜探针^[36]、毛细玻璃管^[72]等控制微球与样品间的距离可以实现无接触成像或增强,但微球尺寸较小,难以操纵,在一定程度上增加了实验系统的复杂性。单个微球成像时,微球边界区域会产生像差畸变等,可通过选取微球中心结果来尽量避免像差,但这也会缩小成像视野。有研究者指出可以通过扫描拼接实现大视场成像^[36],但还需进一步提高微球控制的精度、图像的拼接算法等。

有挑战才会有机遇,随着研究的深入,以上问题会慢慢被解决。同时,在一些应用中微球的优势也会更加凸显。进一步明晰微球调制光场的机理以及相关影响机制是重要的研究方向,这对精确量化、精准使用微球增强光学成像和荧光具有重要意义,可以指导研究者设计新型微球,实现不同需求的光场调控。例如:前面提到的用于增强上转换发光的半微球阵列就是对微球的形状进行了设计,不同高度的半微球阵列对入射光的聚焦强度及距离等存在差异;通过在微球表面构

造同心环结构可以调谐微球产生的光子纳米射流的半峰全宽^[73]等。由于微球较小的尺寸,还可以将其与光纤集成,为制作小型、简单的光学成像设备提供思路。已有研究表明,将微球置于光纤尖端可以在单分子水平上进行基于光纤的远程荧光相关光谱分析^[74]。由于其灵活性,这种系统有望直接插入活体,或者用在化学反应器、精密机器的腔室和其他空间受限的地方进行检查。微球除了用于超分辨成像及荧光增强外,也被用于拉曼散射增强^[75-76]、光学存储^[77]、纳米光刻^[78]、传感^[79]等领域。此外,具有生物相容性的天然微球的研究为活细胞内实时信号探测与成像、多功能生物传感、内窥镜成像和单细胞诊断等提供了新颖手段。微球的本征优势注定会使其在诸多领域大放异彩。

参 考 文 献

- [1] Abbe E. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung[J]. Archiv für Mikroskopische Anatomie, 1873, 9(1): 413-468.
- [2] Rayleigh L. XII. On the manufacture and theory of diffraction-gratings[J]. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1874, 47(310): 81-93.
- [3] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [4] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. Biophysical Journal, 2006, 91(11): 4258-4272.
- [5] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. Nature Methods, 2006, 3(10): 793-796.
- [6] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. Optics Letters, 1994, 19(11): 780-782.
- [7] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [8] Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. Journal of Microscopy, 2000, 198(2): 82-87.
- [9] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [10] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [11] Gustafsson N, Culley S, Ashdown G, et al. Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12471.
- [12] Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, et al. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes[J]. Science, 2017, 355(6325): 606-612.
- [13] Sun D E, Fan X Q, Shi Y J, et al. Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules[J]. Nature Methods, 2021, 18(1): 107-113.
- [14] Akimov A V, Mukherjee A, Yu C L, et al. Generation of single optical plasmons in metallic nanowires coupled to quantum dots[J]. Nature, 2007, 450(7168): 402-406.
- [15] Pompa P P, Martiradonna L, Torre A D, et al. Metal-enhanced fluorescence of colloidal nanocrystals with nanoscale control[J]. Nature Nanotechnology, 2006, 1(2): 126-130.
- [16] Ganesh N, Zhang W, Mathias P C, et al. Enhanced fluorescence emission from quantum dots on a photonic crystal surface[J]. Nature Nanotechnology, 2007, 2(8): 515-520.
- [17] Jayachandriaiah C, Siva Kumar K, Krishnaiah G, et al. Influence of Dy dopant on structural and photoluminescence of Dy-doped ZnO nanoparticles[J]. Journal of Alloys and Compounds, 2015, 623: 248-254.
- [18] Gu F, Wang S F, Lü M K, et al. Structure evaluation and highly enhanced luminescence of Dy³⁺-doped ZnO nanocrystals by Li⁺ doping via combustion method[J]. Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2004, 20(9): 3528-3531.
- [19] Wang Z B, 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.
- [20] Heifetz A, Kong S C, Sahakian A V, et al. Photonic nanojets[J]. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2009, 6(9): 1979-1992.
- [21] Zhu J L, Goddard L L. All-dielectric concentration of electromagnetic fields at the nanoscale: the role of photonic nanojets[J]. Nanoscale Advances, 2019, 1(12): 4615-4643.
- [22] Zhang Q Q, Li J J, Pan X Y, et al. Low-numerical aperture microscope objective boosted by liquid-immersed dielectric microspheres for quantum dot-based digital immunoassays[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(38): 12848-12853.
- [23] 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.
- [24] Hao X, Kuang C F, Liu X, et al. Microsphere based microscope with optical super-resolution capability[J]. Applied Physics Letters, 2011, 99(20): 203102.
- [25] 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.
- [26] Lee S, Li L, Wang Z B, et al. Immersed transparent microsphere magnifying sub-diffraction-limited objects[J]. *Applied Optics*, 2013, 52(30): 7265-7270.
- [27] 徐伟, 袁群, 高志山, 等. 微球透镜超分辨显微成像与检测技术综述[J]. *应用光学*, 2019, 40(6): 1139-1151.
Xu W, Yuan Q, Gao Z S, et al. Review of microsphere optical microscopy for super-resolution imaging and metrology[J]. *Journal of Applied Optics*, 2019, 40(6): 1139-1151.
- [28] Darafsheh A. Influence of the background medium on imaging performance of microsphere-assisted super-resolution microscopy[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(4): 735-738.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Li L, Guo W, Yan Y Z, et al. Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy[J]. *Light: Science & Applications*, 2013, 2(9): e104.
- [33] Yan Y Z, 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.
- [34] Li Y C, Liu X S, Li B J. Single-cell biomagnifier for optical nanoscopes and nanotweezers[J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8: 61.
- [35] 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.
- [36] Wang F F, Liu L Q, Yu H B, et al. Scanning superlens microscopy for non-invasive large field-of-view visible light nanoscale imaging[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13748.
- [37] Bezryadina A, Li J X, Zhao J X, et al. Localized plasmonic structured illumination microscopy with an optically trapped microlens[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(39): 14907-14912.
- [38] Chen L W, Zhou Y, Li Y, et al. Microsphere enhanced optical imaging and patterning: from physics to applications[J]. *Applied Physics Reviews*, 2019, 6(2): 021304.
- [39] Chen L W, Zhou Y, Wu M X, et al. Remote-mode microsphere nano-imaging: new boundaries for optical microscopes[J]. *Opto-Electronic Advances*, 2018, 1(1): 170001.
- [40] 郝翔, 杨青, 匡翠方, 等. 光学移频超分辨成像技术进展[J]. *光学学报*, 2021, 41(1): 0111001.
Hao X, Yang Q, Kuang C F, et al. Optical super-resolution imaging based on frequency shift[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(1): 0111001.
- [41] Hao X, Kuang C F, Li Y H, et al. Evanescent-wave-induced frequency shift for optical superresolution imaging[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(14): 2455-2458.
- [42] Yang S L, Ye Y H, Shi Q F, et al. Converting evanescent waves into propagating waves: the super-resolution mechanism in microsphere-assisted microscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2020, 124(47): 25951-25956.
- [43] Chen Z G, 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.
- [44] Yang H, Trouillon R, Huszka G, et al. Super-resolution imaging of a dielectric microsphere is governed by the waist of its photonic nanojet[J]. *Nano Letters*, 2016, 16(8): 4862-4870.
- [45] Li L Q, Davis L M. Rapid and efficient detection of single chromophore molecules in aqueous solution[J]. *Applied Optics*, 1995, 34(18): 3208-3217.
- [46] Mathis H P, Kalusche G, Wagner B, et al. Steps towards spatially resolved single molecule detection in solution[J]. *Bioimaging*, 1997, 5(3): 116-128.
- [47] Gérard D, Wenger J, Devilez A, et al. Strong electromagnetic confinement near dielectric microspheres to enhance single-molecule fluorescence[J]. *Optics Express*, 2008, 16(19): 15297-15303.
- [48] Gérard D, Devilez A, Aouani H, et al. Efficient excitation and collection of single-molecule fluorescence close to a dielectric microsphere[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 2009, 26(7): 1473-1478.
- [49] Yan Y Z, Zeng Y, Wu Y, et al. Ten-fold enhancement of ZnO thin film ultraviolet-luminescence by dielectric microsphere arrays[J]. *Optics Express*, 2014, 22(19): 23552-23564.
- [50] Yang L X, Yan Y Z, Wang Q, et al. Sandwich-structure-modulated photoluminescence enhancement of wide bandgap semiconductors capping with dielectric microsphere arrays[J]. *Optics Express*, 2017, 25(6): 6000-6014.
- [51] Yang L X, Li L, Wang Q, et al. Over 1000-fold enhancement of the unidirectional photoluminescence from a microsphere-cavity-array-capped QD/PDMS composite film for flexible lighting and displays[J]. *Advanced Optical Materials*, 2019, 7(24): 1901228.
- [52] Hill S C, Boutou V, Yu J, et al. Enhanced backward-directed multiphoton-excited fluorescence from dielectric microcavities[J]. *Physical Review Letters*, 2000, 85(1): 54-57.
- [53] Lecler S, Haacke S, Lecong N, et al. Photonic jet driven non-linear optics: example of two-photon fluorescence enhancement by dielectric microspheres[J]. *Optics Express*, 2007, 15(8): 4935-4942.

- [54] Liu W W, Li X H, Song Y L, et al. Cooperative enhancement of two-photon-absorption-induced photoluminescence from a 2D perovskite-microsphere hybrid dielectric structure[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(26): 1707550.
- [55] Pérez-Rodríguez C, Imanieh M H, Martín L L, et al. Study of the focusing effect of silica microspheres on the upconversion of Er^{3+} - Yb^{3+} codoped glass ceramics[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2013, 576: 363-368.
- [56] Liang L L, Teh D B L, Dinh N D, et al. Upconversion amplification through dielectric superlensing modulation [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1391.
- [57] Liu Q Y, Liu H C, Li D Y, et al. Microlens array enhanced upconversion luminescence at low excitation irradiance[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(29): 14070-14078.
- [58] Wang F, Liu X G. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(4): 976-989.
- [59] Auzel F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids[J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(1): 139-174.
- [60] Zhang Y J, Yan Y Z, Yang L X, et al. Ultraviolet luminescence enhancement of planar wide bandgap semiconductor film by a hybrid microsphere cavity/dual metallic nanoparticles sandwich structure[J]. *Optics Express*, 2019, 27(11): 15399-15412.
- [61] Zhang W N, Lei H X. Fluorescence enhancement based on cooperative effects of a photonic nanojet and plasmon resonance[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(12): 6596-6602.
- [62] Ji Y N, Xu W, Ding N, et al. Huge upconversion luminescence enhancement by a cascade optical field modulation strategy facilitating selective multispectral narrow-band near-infrared photodetection[J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 184.
- [63] Li Y C, Liu X S, Yang X G, et al. Enhancing upconversion fluorescence with a natural bio-microlens [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(11): 10672-10680.
- [64] Chen X X, Wu T L, Gong Z Y, et al. Lipid droplets as endogenous intracellular microlenses[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 242.
- [65] 李姮, 陈熙熙, 张垚, 等. 可变焦叶绿体光学微透镜[J]. *光学学报*, 2022, 42(4): 0411003.
- Li H, Chen X X, Zhang Y, et al. Chloroplast optical microlens with variable focus[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(4): 0411003.
- [66] Darafsheh A. Photonic nanojets and their applications[J]. *Journal of Physics: Photonics*, 2021, 3(2): 022001.
- [67] Chiasera A, Dumeige Y, Féron P, et al. Spherical whispering-gallery-mode microresonators[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2010, 4(3): 457-482.
- [68] Righini G C, Dumeige Y, Féron P, et al. Whispering gallery mode microresonators: fundamentals and applications[J]. *La Rivista Del Nuovo Cimento*, 2011, 34(7): 435-488.
- [69] Yan Y Z, Liu J W, Xing C, et al. Parametric study on photoluminescence enhancement of high-quality zinc oxide single-crystal capping with dielectric microsphere array[J]. *Applied Optics*, 2018, 57(27): 7740-7749.
- [70] Biccari F, Hamilton T, Ristori A, et al. Quantum dots luminescence collection enhancement and nanoscopy by dielectric microspheres[J]. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2020, 37(1): 1900431.
- [71] Aouani H, Djaker N, Wenger J, et al. High-efficiency single molecule fluorescence detection and correlation spectroscopy with dielectric microspheres[J]. *Proceedings of SPIE*, 2010, 7571: 75710A.
- [72] Krivitsky L A, Wang J J, Wang Z B, et al. Locomotion of microspheres for super-resolution imaging[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3501.
- [73] Wu M X, Huang B J, Chen R, et al. Modulation of photonic nanojets generated by microspheres decorated with concentric rings[J]. *Optics Express*, 2015, 23(15): 20096-20103.
- [74] Aouani H, Deiss F, Wenger J, et al. Optical-fiber-microsphere for remote fluorescence correlation spectroscopy[J]. *Optics Express*, 2009, 17(21): 19085-19092.
- [75] Du C L, Kasim J, You Y M, et al. Enhancement of Raman scattering by individual dielectric microspheres[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011, 42(2): 145-148.
- [76] Huang S H, Jiang X F, Peng B, et al. Surface-enhanced Raman scattering on dielectric microspheres with whispering gallery mode resonance[J]. *Photonics Research*, 2018, 6(5): 122-132.
- [77] Kong S C, Sahakian A V, Heifetz A, et al. Robust detection of deeply subwavelength pits in simulated optical data-storage disks using photonic jets[J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 92(21): 211102.
- [78] Jacassi A, Tantussi F, Dipalo M, et al. Scanning probe photonic nanojet lithography[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(37): 32386-32393.
- [79] 刘笑尘, 谢严, 陈溢琦, 等. 光纤耦合双微球谐振腔及其模式分裂特性[J]. *光学学报*, 2021, 41(13): 1306017.
- Liu X C, Xie Y, Chen Y Q, et al. Fiber coupled double microsphere resonator and its mode splitting characteristics [J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(13): 1306017.