

基于倏逝波界面散射的单个纳米颗粒无标记成像

江丽雯^{1,2}, 孙旭晴¹, 刘虹遥¹, 湛雅琴¹, 熊伟¹, 张朝前¹, 路鑫超^{1,3}

¹中国科学院微电子研究所微电子仪器设备研发中心, 北京 100029;

²中国科学院大学, 北京 100049;

³集成电路测试技术北京重点实验室, 北京 100088

摘要 介绍了一种利用倏逝波界面散射对单个纳米颗粒进行无标记成像的方法。分别使用全内反射(TIR)倏逝波与表面等离子激元(SPPs)两种倏逝波与单个纳米颗粒相互作用, 激发纳米颗粒极化并发生散射, 所产生的界面散射与入射倏逝波发生干涉, 形成了纳米颗粒极化场与抛物线形干涉条纹的特征成像。分别对直径为 500, 200, 100 nm 的聚苯乙烯颗粒进行了单个纳米颗粒无标记成像。比较了两种倏逝波界面散射对单个纳米颗粒成像结果, 发现表面等离子激元界面散射成像中的单个纳米颗粒极化强度约是全内反射极化强度的 10 倍, 并且接近于暗场成像。因此, 表面等离子激元界面散射对单个纳米颗粒无标记成像具有更高灵敏度。所提单个纳米颗粒无标记成像方法可以拓展到病毒检测、生物单分子成像等领域。

关键词 表面光学; 无标记成像; 单个纳米颗粒; 倏逝波界面散射; 全内反射; 表面等离子激元

中图分类号 O436.2

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201838.0624001

Single Nanoparticle Label-Free Imaging Based on Evanescent Wave In-Plane Scattering

Jiang Liwen^{1,2}, Sun Xuqing¹, Liu Hongyao¹, Chen Yaqin¹, Xiong Wei¹,
Zhang Chaoqian¹, Lu Xinchao^{1,3}

¹Microelectronic Instrument and Equipment Center, Institute of Microelectronics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³Beijing Key Laboratory of IC Test Technology, Beijing 100088, China

Abstract A method for label-free imaging to single nanoparticle by evanescent wave in-plane scattering is presented. Using the two evanescent waves of total internal reflection (TIR) evanescent wave and surface plasmon polaritons (SPPs) to interact with a single nanoparticle, respectively, which excites the nanoparticle polarization and scatter. Generated interfacial scattering is interfered with incident evanescent wave, which forms a characteristic imaging of the polarization field of the nanoparticles and the parabolic interference fringes. Single nanoparticle label-free imaging is performed on three polystyrene nanoparticles with the diameters of 500, 200, 100 nm. The imaging results of two evanescent wave in-plane scattering on single nanoparticle are compared. It indicates that the nanoparticle polarization of SPPs in-plane scattering is approximately 10 times stronger than that of TIR in-plane scattering and close to dark field imaging. As a result, SPPs in-plane scattering manifests the better sensitivity to label-free single nanoparticle imaging. This single nanoparticle label-free imaging method can be extended to areas such as virus detection and single bio-molecule imaging.

Key words optics at surfaces; label-free imaging; single nanoparticle; evanescent wave in-plane scattering; total internal reflection; surface plasmon polaritons

OCIS codes 240.6700; 110.2970; 160.4236; 260.6970; 240.6680

收稿日期: 2017-11-14; 收到修改稿日期: 2018-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(61302014, 61404162, 61205098)、中国科学院科研装备研制项目(YZ201447)、北京市自然科学基金(4162069)、广东省科技计划项目(2014A040401053, 2016A040403086)、广州市科技计划项目(201604020005)

作者简介: 江丽雯(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事单个纳米颗粒无标记探测方面的研究。E-mail: jiangliwen@ime.ac.cn

导师简介: 路鑫超(1977-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事表面等离子激元及纳米光学检测方面的研究。

E-mail: luxinchao@ime.ac.cn(通信联系人)

1 引 言

随着对生物微观领域的不断探索,可以探测单个纳米物质的光学显微成像技术已经成为了生命科学、生物化学领域研究生物活细胞内分子成像、单分子示踪、病毒检测等的重要手段^[1-3]。光学显微成像技术由于成本较低、无需复杂样品预处理等特点,已经被广泛应用于生物领域。但普通的光学显微成像方法由于受到光学衍射极限的限制,很难检测到尺寸小于 200 nm 的单个物质,例如生物大分子、病毒等。

目前,全内反射荧光显微技术(TIRFM)被广泛应用于生物单分子研究中,利用荧光探针对待测样品进行标记,通过全内反射(TIR)照明产生的倏逝波激发荧光探针,从而实现对待测样品成像^[4]。此技术的优势在于利用倏逝波照明,使轴向照明区域限制在样品表面百纳米量级,减少了背景光的影响,因而成为研究细胞表面科学(如细胞膜外分泌过程及单分子示踪等)方面的重要技术手段^[5-7]。然而,传统荧光染料分子的荧光漂白效应无法对单分子进行长期示踪,同时,荧光标记会对待测样品的本征行为产生影响。因此,人们开始研究基于全内反射的无标记显微成像技术。全内反射无标记显微成像技术利用全内反射照明产生的倏逝波激发单个待测纳米物质散射,收集空间散射光并与全内反射光进行分离,实现了对单个纳米物质的无标记暗场成像。2008年,He等^[8]利用该技术实现了对溶液中及Hela细胞膜上直径为40 nm的单个金颗粒的示踪。2012年,Enoki等^[9]对附着在盖玻片上的直径为100 nm左右的单个流感病毒进行了成像。

作为一种激发于金属与电介质分界面并沿其传播的倏逝波,表面等离子激元(SPPs)在纳米光电子学研究领域中起到了重要作用^[10],由于其共振效应,表面等离子激元在分析生物分子相互作用的生物传感器方面取得了广泛的应用^[11]。表面等离子激元成像已经实现对单个纳米颗粒的实时无标记探测^[12]。在生物单分子成像领域,此方法已经实现对单个脱氧核糖核酸(DNA)分子^[13]、病毒分子^[14]的无标记成像以及细胞内细胞器的动态示踪^[15]。干涉散射显微成像(iSCAT)是一种利用明场照明纳米尺寸的弱散射物质,然后通过收集入射光与散射光的干涉信息进行成像的方法^[16],其已实现对病毒^[17-19]、尺寸在50~100 nm范围的脂质囊泡^[20]以及单个蛋白质分子的无标记成像^[21-22]。基于拉曼散射光谱分析的近场光学成像方法也广泛应用于生物化学等领域

的单分子探测及分析中^[23-26]。

本文实现了一种新型纳米颗粒无标定成像方法,通过对单个纳米颗粒引起的倏逝波极化及界面散射引起的干涉场进行成像,实现了对直径为100, 200, 500 nm的单个聚苯乙烯颗粒的无标记成像。研究了全内反射倏逝波以及表面等离子激元两种倏逝波的界面散射成像,并对两种倏逝波的成像结果进行了对比分析,证明了该方法对单个纳米颗粒进行无标记快速成像的可行性,未来该方法可用于病毒快速检测以及病毒或单分子示踪研究中。

2 实验过程及原理

2.1 颗粒制备

要实现单个纳米颗粒成像,需要将纳米颗粒分散地制备在放置样品的盖玻片表面。实验中选用了三种纳米颗粒溶液制备分散颗粒样品,分别是直径为500, 200, 100 nm的聚苯乙烯乳胶球溶液(质量分数为2.5%)。为了避免纳米颗粒在制备过程中发生团簇,需要将纳米颗粒溶液用乙醇稀释至合适浓度,减弱相邻纳米颗粒的团簇作用力。而且在制备过程中加快溶液蒸发速度,使纳米颗粒在团簇前可以有效地附着在盖玻片表面。经多次试验验证,得出制备分散样品聚苯乙烯乳胶球溶液的最佳浓度约为 1.79×10^{-3} mg/mL。操作过程为:将盖玻片放置在加热板上,用滴管在盖玻片中心缓慢地滴一滴稀释后的颗粒溶液,待乙醇挥发后停止加热。利用扫描电子显微镜(SEM)观察盖玻片表面(图1),验证了盖玻片上的待测纳米颗粒分散程度符合单个纳米颗粒成像实验要求。

2.2 实验过程

研究中实现了对全内反射产生的倏逝波与表面等离子激元两种倏逝波的激发与探测。全内反射倏逝波成像装置示意图如图2(a)所示,其中,光沿 xz 平面斜入射到盖玻片下表面,激发沿 x 方向传播的倏逝波。波长为633 nm的激光器发出入射光,经整形后聚焦到物镜后焦平面,通过调节入射光在物镜后焦平面上的聚焦位置改变激发倏逝波的入射角度。物镜的数值孔径为1.7,由一维电动平移台控制入射光在物镜后焦平面上的聚焦位置,电动平移台移动精度为0.01 mm,相应的角度改变量为 0.2165° 。根据折射定律,入射角大于全内反射临界角 θ_{TIR} 时,入射光在盖玻片与空气界面上发生全内反射。临界角 $\theta_{\text{TIR}} = \sin^{-1}(n_2/n_1)$,其中盖玻片折射率 $n_1 = 1.78$,空气折射率 $n_2 = 1$,计算得到 θ_{TIR} 约为

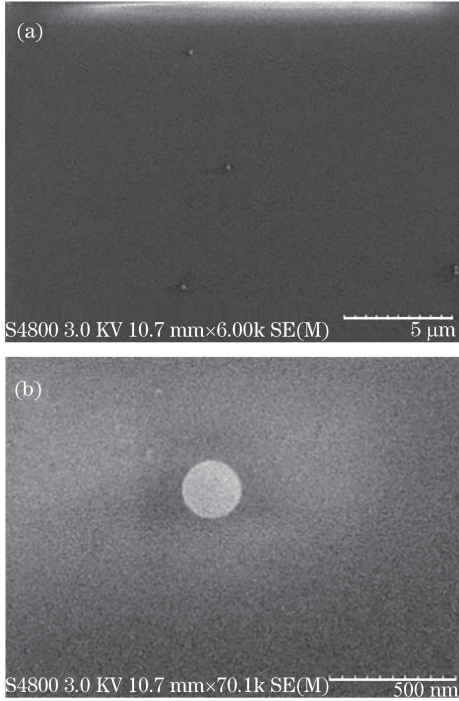


图 1 (a) 200 nm 聚苯乙烯颗粒分布 SEM 图；
(b) 单个颗粒 SEM 图

Fig. 1 (a) SEM image of 200 nm polystyrene nanoparticle distribution; (b) SEM image of single nanoparticle

34.18°。全内反射反射率 R_{TIR} 随入射角度 θ_{TIR} 的变化如图 2(c) 所示,全反射光被物镜收集并传输到点和电荷耦合器件(CCD)上实现远场成像。

在全内反射倏逝波激发装置基础上,将盖玻片表面蒸镀 50 nm 厚的金薄膜[图 2(b)],同时在入射光路中插入偏振片,使入射光以 p 偏振态聚焦到物镜后焦平面,成为可激发表面等离激元的 Kretschmann 物镜耦合方式。在盖玻片-金界面激发的全反射倏逝波,可以补偿入射光与表面等离激元之间的波矢差,激发沿金-空气界面传播的表面等离激元。表面等离激元最佳激发角度 θ_{SPP} 满足公式 $k_g \sin^{-1} \theta_{SPP} = k_{SPP}$, 其中入射光波矢 $k_g = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_g}$, 表面

等离激元波矢 $k_{SPP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m}{\epsilon_m + 1}}$, ω 为入射光角频率, c 为光速, ϵ_g 为盖玻片介电常数, ϵ_m 为金薄膜介电常数,加上在 633 nm 波长下金薄膜的介电常数为 $0.12 + 3.29i$, 计算得到 $\theta_{SPP} = 36.1^\circ$ 。反射率 R_{SPP} 随入射角度 θ_{SPP} 变化如图 2(d) 所示。实验中,调节入射光角度,通过 CCD 观察到物镜收集光随入射角改变至最弱的位置,可以观察到表面等离激元的激发,实验得到 θ_{SPP} 约为 37° 。

在实现全内反射倏逝波与表面等离激元激发的

基础上,将表面制备有分散纳米颗粒的盖玻片放置于倒置高数值孔径油浸物镜上,盖玻片与物镜之间配以折射率匹配的浸没油。激发的倏逝波在沿界面传播过程中遇到单个纳米颗粒,纳米颗粒被倏逝波极化并发生散射,一部分被散射到空间呈立体角分布,称为空间散射,另一部分为仍沿界面传播的界面散射。界面散射在传播过程中会与沿界面传播的激发倏逝波发生干涉。利用倏逝波的泄漏辐射效应^[27],单个纳米颗粒的界面散射信息将与反射光一起传输至远场,被 CCD 接收。由于界面散射及干涉效应,CCD 上呈现的图像包括两部分,一部分为单个纳米颗粒极化引起的极化区域,另一部分为界面散射与激发倏逝波干涉引起的抛物线形同心条纹。

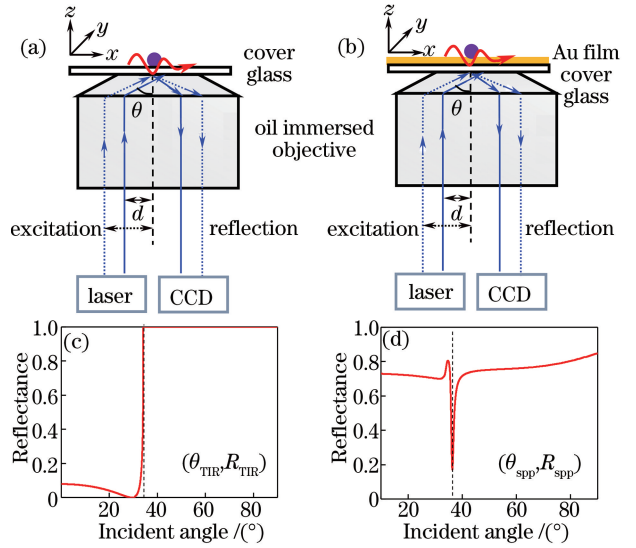


图 2 (a) 基于全内反射倏逝波激发的成像装置示意图；
(b) 基于表面等离激元激发的成像装置示意图；
(c) 全内反射反射率随入射角度的变化；
(d) 表面等离激元反射率随入射角度的变化

Fig. 2 (a) Schematic of imaging setup based on TIR evanescent wave excitation; (b) schematic of imaging setup based on SPPs excitation; (c) variation of TIR reflectance with incident angle; (d) variation of SPPs reflectance with incident angle

3 实验结果与分析

3.1 成像处理及分析

实验中经 CCD 采集获得的单个纳米颗粒成像原始图像,受到反射背景光、CCD 暗噪声等影响,成像对比度降低。为了提高成像对比度,需要对实验中采集的纳米颗粒成像图做进一步降噪处理。一次单个纳米颗粒成像过程需要采集两组数据:信号成像与背景成像。信号成像为对单个纳米颗粒成像结

果,背景成像为对无纳米颗粒处的空白区域成像。为了消除实验带来的测量误差,分别选取 20 个测量结果进行平均处理后,将信号成像与背景成像的采集数据进行相减,并减去实际测量的 CCD 暗噪声,可除去反射背景光与 CCD 暗噪声等影响,增强成像对比度,得到最终的单个纳米颗粒成像图。

利用全内反射倏逝波以及表面等离子激元分别对直径为 500,200,100 nm 的聚苯乙烯颗粒进行了成像。经上述数据处理后的单个纳米颗粒成像如图 3 所示。由图 3 可见,全内反射倏逝波以及表面等离子激元对单个纳米颗粒的成像均包含两方面的特征:一方面为由单个纳米颗粒受倏逝波激发极化而产生的极化区域;另一方面为由单个纳米颗粒产生的界面散射与入射倏逝波发生干涉,所产生的抛物线状同心干涉条纹,该特征符合对单个纳米颗粒散射过程的分析。从成像结果可以看出,表面等离子激元引起单个纳米颗粒极化强度更强。此外,表面等离子激元激发的单个纳米颗粒界面散射成像接近于暗场成像,干涉条纹更加明显,干涉条纹长度所表征的倏逝波传输长度更长,成像效果更好。

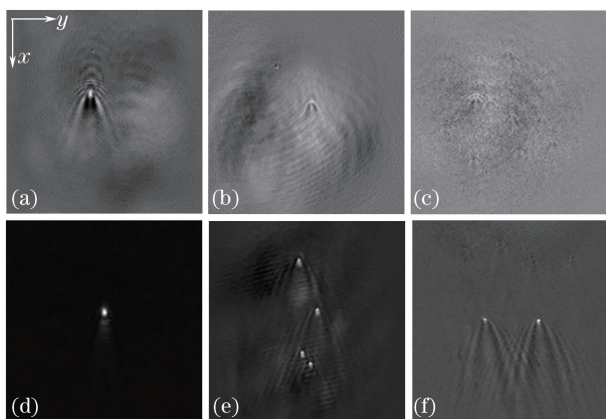


图 3 基于全内反射倏逝波的直径为(a) 500 nm、(b) 200 nm 和(c) 100 nm 的单个聚苯乙烯纳米颗粒的成像;基于表面等离子激元的直径为(d) 500 nm、(e) 200 nm 和(f) 100 nm 的单个聚苯乙烯纳米颗粒的成像

Fig. 3 Imaging of single polystyrene nanoparticle with the diameter of (a) 500 nm, (b) 200 nm and (c) 100 nm based on TIR evanescent wave; imaging of single polystyrene nanoparticle with the diameter of (d) 500 nm, (e) 200 nm and (f) 100 nm based on SPPs

3.2 仿真结果

使用 Lumerical 公司的 FDTD Solutions 软件,对基于倏逝波的单个纳米颗粒界面散射进行了建模仿真。图 4(a)、(b)分别为在全内反射倏逝波以及表面等离子激元场中,对直径为 200 nm 的单个聚苯

乙烯颗粒界面散射场电场强度振幅平方 $|\vec{E}|^2$ 的空间分布的仿真结果。仿真设置中,探测平面的位置分别为盖玻片-空气界面、金-空气界面;设置的入射角度与实验中入射角度一致,为 37° ;入射光波长为 633 nm,在金-空气界面处产生的表面等离子激元波长为 593 nm,在盖玻片-空气界面产生的全内反射倏逝波波长为 591 nm。可以看出,两种界面散射均显示了与实验结果相似的特征图案:中心的颗粒极化场区域及界面散射引起的干涉条纹。并且,表面等离子激元对单个纳米颗粒的极化强度大于全反射倏逝波引起的单个纳米颗粒极化强度,仿真结果与实验结果显示了很好的一致性。

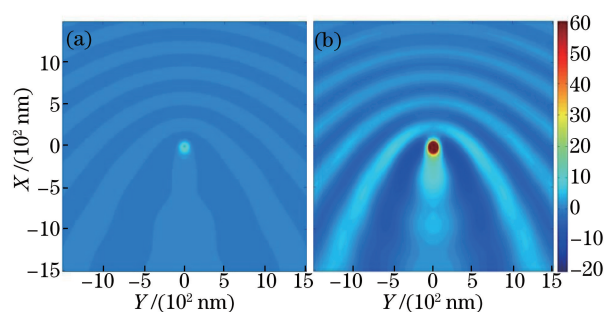


图 4 $|\vec{E}|^2$ 的空间分布仿真。

(a)全内反射倏逝波;(b)表面等离子激元

Fig. 4 Spatial distribution simulation of $|\vec{E}|^2$.

(a) TIR; (b) SPPs

3.3 极化强度比较

实验中对全内反射倏逝波和表面等离子激元引起的单个纳米颗粒极化强度进行了比较。以单个纳米颗粒成像中心亮点区域内的像素灰度值总和表征单个纳米颗粒极化强度。对三种纳米颗粒的纳米颗粒极化强度进行了处理与比较。为了提高测量准确性,对一种纳米颗粒样品中的不同颗粒进行多次实验成像并取平均。数据处理方法如下:选取成像中单个颗粒的极化区域,即中心亮点区域,并对区域内所有像素的灰度值进行加合,得到一个纳米颗粒的极化强度数,重复进行多次测量后,去掉最大值及最小值,并对多次测量结果进行平均,得到这种纳米颗粒的极化强度值。图 5 为分别采用全内反射倏逝波与表面等离子激元对直径为 500,200,100 nm 的单个聚苯乙烯纳米颗粒成像实验的极化强度对比图。可以看出表面等离子激元对三种单个纳米颗粒的极化强度约是全内反射倏逝波对纳米颗粒的极化强度的 10 倍。更高的单个纳米颗粒极化强度证明了表面等离子激元的极化强度增强效应,这使得表面等离子激

元界面散射成像相比于全内反射倏逝波界面散射具有更高的灵敏度,可探测到更小尺寸的单纳米颗粒。

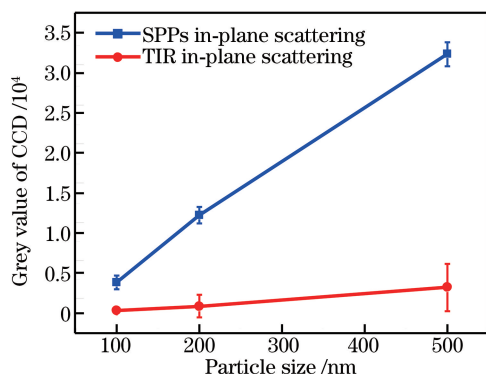


图5 全内反射倏逝波与表面等离激元对单个聚苯乙烯纳米颗粒的极化强度对比

Fig. 5 Comparison of the polarization intensity of single polystyrene nanoparticle with TIR evanescent wave and SPPs

4 结 论

利用单个纳米颗粒引起的倏逝波界面散射,分别实现了对直径为 500,200,100 nm 的聚苯乙烯颗粒的单颗粒无标记快速成像。实验中使用全内反射倏逝波与表面等离激元两种倏逝波界面散射对单个纳米颗粒成像,均观察到了中心亮场以及抛物线形同心干涉条纹的成像特征,并解释了这一现象的成因:倏逝波引起单个纳米颗粒极化及散射,所产生的界面散射与入射倏逝波发生干涉,进而形成了纳米颗粒极化场与抛物线形干涉条纹的特征成像。比较了两种倏逝波的成像结果,发现表面等离激元成像接近于暗场成像,并且其单个纳米颗粒极化强度约是全内反射极化强度的 10 倍,因而成像灵敏度更高。所提的单个纳米颗粒无标记成像方法可以拓展到病毒检测、生物单分子成像等领域。

参 考 文 献

- [1] Pan L T, Hu F, Zhang X Z, *et al.* Multicolor single-molecule localization super-resolution microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318010.
潘雷霆, 胡芬, 张心正, 等. 多色单分子定位超分辨显微成像术[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318010.
- [2] Yang Y L, Zong W J, Wu R L, *et al.* Light-sheet fluorescence microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0318007.
杨豫龙, 宗伟建, 吴润龙, 等. 光片荧光显微成像 [J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0318007.
- [3] Luo Y, Liang X B, Li C, *et al.* Influence of

supercontinuum laser on bioluminescence imaging technology[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2016, 53(12): 121401.

罗韵, 梁小宝, 李超, 等. 超连续谱激光对生物荧光激发效应的影响[J]. *激光与光电子学进展*, 2016, 53(12): 121401.

- [4] Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology[J]. *Methods in Enzymology*, 2003, 361: 1-33.
- [5] Schmoranzner J, Goulian M, Axelrod D, *et al.* Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy[J]. *Journal of Cell Biology*, 2000, 149(1): 23-31.
- [6] Vale R D, Funatsu T, Pierce D W, *et al.* Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules[J]. *Nature*, 1996, 380(6573): 451-453.
- [7] Bowser D N, Khakh B S. Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(10): 4212-4217.
- [8] He H, Ren J C. A novel evanescent wave scattering imaging method for single gold particle tracking in solution and on cell membrane[J]. *Talanta*, 2008, 77(1): 166-171.
- [9] Enoki S, Lino R, Morone N, *et al.* Label-free single-particle imaging of the influenza virus by objective-type total internal reflection dark-field microscopy [J]. *Public Library of Science ONE*, 2012, 7(11): e49208.
- [10] Fang Z Y, Zhu X. Plasmonics in nanostructures[J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(28): 3840-3856.
- [11] Homola J, Yee S S, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, 54(1-2): 3-15.
- [12] Zybin A, Kuritsyn Y A, Gurevich E L, *et al.* Real-time detection of single immobilized nanoparticles by surface plasmon resonance imaging [J]. *Plasmonics*, 2010, 5(1): 31-35.
- [13] Yu H, Shan X N, Wang S P, *et al.* Plasmonic imaging and detection of single DNA molecules[J]. *American Chemical Society Nano*, 2014, 8(4): 3427-3433.
- [14] Wang S P, Shan X N, Patel U, *et al.* Label-free imaging, detection, and mass measurement of single viruses by surface plasmon resonance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(37): 16028-16032.
- [15] Yang Y Z, Yu H, Shan X N, *et al.* Label-free tracking of single organelle transportation in cells

- with nanometer precision using a plasmonic imaging technique[J]. *Small*, 2015, 11(24): 2878-2884.
- [16] Ortega-Arroyo J, Kukura P. Interferometric scattering microscopy (iSCAT): new frontiers in ultrafast and ultrasensitive optical microscopy [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, 14(45): 15625-15636.
- [17] Ewers H, Jacobsen V, Klotzsch E, *et al.* Label-free optical detection and tracking of single virions bound to their receptors in supported membrane bilayers [J]. *Nano Letters*, 2007, 7(8): 2263-2266.
- [18] Kukura P, Ewers H, Müller C, *et al.* High-speed nanoscopic tracking of the position and orientation of a single virus [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(12): 923-927.
- [19] Daaboul G G, Yurt A, Zhang X, *et al.* High-throughput detection and sizing of individual low-index nanoparticles and viruses for pathogen identification [J]. *Nano Letters*, 2010, 10(11): 4727-4731.
- [20] Andrecka J, Spillane K M, Ortega-Arroyo J, *et al.* Direct observation and control of supported lipid bilayer formation with interferometric scattering microscopy [J]. *American Chemical Society Nano*, 2013, 7(12): 10662-10670.
- [21] Ortega-Arroyo J, Andrecka J, Spillane K M, *et al.* Label-free, all-optical detection, imaging, and tracking of a single protein [J]. *Nano Letters*, 2014, 14(4): 2065-2070.
- [22] Piliarik M, Sandoghdar V. Direct optical sensing of single unlabelled proteins and super-resolution imaging of their binding sites [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4495.
- [23] Zhang W H, Fang Z Y, Zhu X. Near-field Raman spectroscopy with aperture tips [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(7): 5095-5109.
- [24] Nie S, Emory S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1102-1106.
- [25] Zhang R, Zhang Y, Dong Z C, *et al.* Chemical mapping of a single molecule by plasmon-enhanced Raman scattering [J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 82-86.
- [26] Huang J N, Zhao Y Q, Zhang X L, *et al.* Ordered Ag/Si nanowires array: wide-range surface-enhanced Raman spectroscopy for reproducible biomolecule detection [J]. *Nano Letters*, 2013, 13(11): 5039-5045.
- [27] Hohenau A, Krenn J R, Drezet A, *et al.* Surface plasmon leakage radiation microscopy at the diffraction limit [J]. *Optics Express*, 2011, 19(25): 25749-25762.