

可变焦叶绿体光学微透镜

李姮, 陈熙熙, 张珏, 李宇超^{**}, 李宝军^{*}

暨南大学纳米光子学研究院, 广东 广州 511443

摘要 光学微透镜在光学成像、信号探测、生物传感等方面有重要的应用。针对现有固体微透镜难以变焦和生物不兼容的问题, 提出将细胞内的叶绿体作为天然微透镜, 并研究了叶绿体微透镜的聚焦特性及其在光学成像和信号探测中的应用。研究表明, 叶绿体微透镜对不同波长的入射光能产生聚焦效应。借助光镊产生的光力可实现叶绿体形状的可控变化, 进而可实现对叶绿体微透镜焦距的调节, 调节范围为 15~45 μm 。由于叶绿体微透镜具有光束聚焦特性, 故其能够应用到亚波长结构的成像和荧光信号的增强中。在实验中, 叶绿体微透镜实现了对线宽为 200 nm 的光栅结构和细胞内部肌动蛋白丝的光学成像, 以及对量子点荧光信号的探测和增强。

关键词 成像系统; 微透镜; 光镊; 生物成像; 光学探测; 叶绿体

中图分类号 O439

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202242.0411003

Chloroplast Optical Microlens with Variable Focus

Li Heng, Chen Xixi, Zhang Yao, Li Yuchao^{**}, Li Baojun^{*}*Institute of Nanophotonics, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 511443, China*

Abstract Optical microlenses have important applications in optical imaging, signal detection, biosensing, and other fields. As existing solid microlenses have invariable focuses and are biologically incompatible, chloroplasts in cells are used as natural microlenses, and the focusing properties of chloroplast microlenses and the application of such microlens in optical imaging and signal detection are studied. The results show that chloroplast microlens can focus incident lights with different wavelengths. The optical force generated by optical tweezers can be leveraged to control the shapes of the chloroplasts, and thereby adjust the focal length of the chloroplast microlens. The focal length can be adjusted in the range of 15–45 μm . Due to their ability to focus light, chloroplast microlenses can be applied to the imaging of subwavelength structures and the enhancement of fluorescence signals. In the experiment, optical imaging of the grating structure with a linewidth of 200 nm and actin filaments inside cells, as well as detection and enhancement of the fluorescence signal of quantum dots are achieved by the chloroplast microlens.

Key words imaging systems; microlenses; optical tweezers; bioimaging; optical detection; chloroplasts

1 引言

光学微透镜作为一种重要的光学器件, 具有小型化、可集成等优点, 在光学成像、信号探测、光通信和微流体传感等领域中有着广泛的应用。现有的光学微透镜按材料划分, 可分为固体微透镜^[1-6]、液体微透镜^[7-8]和液晶微透镜^[9-10]。由于固体微透镜折射率较高, 因此其具有良好的聚焦性能^[11-13]。然而,

固体微透镜的性能受到了固体材料的限制, 在实际应用中存在着难以移动和变焦的问题。与固体微透镜不同, 液体微透镜具有变焦范围大的优点, 可通过机械力^[14-15]、热变形^[16-17]和电压控制^[18-19]等方式改变其表面曲率, 但液体微透镜在实际应用中存在液体蒸发、漏液以及自身重力会引起变形等缺点。液晶微透镜在常温环境中能保持形态稳定, 改变外加的驱动电压可使其折射率发生变化, 进而改变其焦

收稿日期: 2021-07-09; 修回日期: 2021-08-11; 录用日期: 2021-08-27

基金项目: 国家自然科学基金(61905092, 61827822)、广东省自然科学基金(2021B1515020046)

通信作者: *baojunli@jnu.edu.cn; **liyuchao@jnu.edu.cn

距范围。然而,外加电场具有非均匀性,容易造成光学失真。此外,现有的微透镜都需要人工合成,与生物细胞和组织不相容。因此,亟需寻找一种天然存在、与生物兼容且焦距可调的光学微透镜。

一些生物体在进化过程中具备了对光束进行调控的能力^[20-22]。例如,球形的藻类细胞能够利用聚光效应,提高光合作用的效率^[23]。脊椎动物细胞内由中性脂质和色素组成的液滴能选择性地调控光强^[24]。上述现象使得在生物体中寻找天然存在的可变焦生物微透镜成为可能。叶绿体是高等植物细胞内特有的细胞器,呈球形或椭球形,它的外膜主要是由蛋白质和脂质构成的富有弹性的生物膜^[25]。由于叶绿体的主要功能是进行光合作用,故其对太阳光具有调控能力,是一种潜在的光学微透镜材料。

叶绿体可作为可变焦微透镜的关键是叶绿体在外力作用下能发生形变。目前,使生物体产生形变的方法主要有压痕法^[26]、微管吸吮法^[27]和光镊拉伸法^[28]等。其中,光镊技术利用高度聚焦的激光束对生物体施加光学梯度力和光学散射力以实现生物体的捕获、排列、旋转和拉伸等光学操作。由于光镊技术具有非接触、无损伤的优势^[29-31],因此被广泛应用于物理光学、生命科学等研究领域,成为细胞拉伸^[32]、细胞分化^[33]和颗粒组装^[34]等研究的重要工具。

本研究工作发现细胞内的叶绿体具有聚光能力,通过丁达尔效应对不同形态和不同直径的叶绿体的光聚焦特性进行了系统且深入的研究。此外,利用光镊技术实现了对细胞内叶绿体的捕获和拉伸,构建了焦距可调的叶绿体微透镜,并将其应用于对光栅结构和植物细胞内肌动蛋白丝的放大成像以及对量子点荧光信号的增强。

2 实验部分

2.1 仪器设备

图 1 为实验装置和材料表征。采用高速扫描光镊系统(Aresis 公司生产的 Tweez250si)对叶绿体进行捕获和拉伸,该系统的光路结构如图 1(a)所示。首先,利用声光调制器(AOD)对波长为 1064 nm 的近红外激光进行时空分布调制。然后,利用扩束器对调制后的激光进行扩束,扩束后的激光被双色镜反射后会进入高数值孔径物镜,并聚焦

到样品处。此外,在光镊系统中配置了荧光模块,荧光光源为自制冷 LED 灯,利用准直器对 LED 发出的光进行准直,准直光通过滤波片后会被双色镜向上反射,光束经过物镜后可以激发样品的荧光。在实验过程中采用高速 CCD 记录荧光信号,并在计算机屏幕上实时显示。光镊捕获和拉伸叶绿体的原理如图 1(b)和图 1(c)所示。叶绿体在光梯度力的作用下被稳定束缚在聚焦光束的焦点附近,AOD 可以改变激光光束的位置,叶绿体会随着激光位置的改变而移动。在利用双光束拉伸叶绿体的过程中,光势阱分别设置在叶绿体的两端,其中一个势阱用于固定叶绿体,另一个势阱作为手柄,可以自由移动,此时叶绿体会被相应拉伸,发生轴向形变。利用光镊可以同时捕获和移动多个叶绿体微透镜,并排列成特定的图案,进而可以提高操控效率,如图 1(d)~(f)所示。此外,光镊移动叶绿体的最大速度(v)与激光功率(P)呈正相关,如图 1(g)所示。因此,增大激光功率可以有效提高叶绿体的移动速度。

2.2 材料准备

实验中所用的叶绿体是从轮叶黑藻叶子中提取的。具体过程:1)选取 5~8 片新鲜的黑藻叶片,洗净后用镊子撕裂叶片并放入离心管中。在离心管内注入 1.5 mL 的 NaCl 溶液(体积分数为 2%),用于维持溶液的渗透压,避免叶绿体被破坏;2)过滤掉溶液中的叶片残渣,在转速为 1000 r/min 的离心机中离心 2 min,倒去上层清液;3)向沉淀物中注入 1 mL 的 NaCl 等渗溶液。此过程重复三次,可得到叶绿体悬浮液。

为验证叶绿体的光聚焦能力,实验利用光纤探针将入射光照射到叶绿体表面上。实验中所用的光纤探针是通过熔融拉锥法制备的。在加热光纤前,首先用光纤钳剥除单模光纤表面的涂覆层和缓冲层,留出一段长为 4 cm,直径为 125 μm 的裸光纤,并在其外面套上毛细玻璃管(内径为 0.9~1.1 mm),以避免光纤在拉制过程中被折断。然后,剥除光纤包层,将纤芯置于酒精灯外焰(温度约 500 $^{\circ}\text{C}$)上方加热约 20 s 后,沿光轴方向进行拉伸(速度为 4 mm/s)。当光纤熔融断裂后,其末端会形成特定大小的锥形结构(锥角为 48 $^{\circ}$ 、尖端直径为 3 μm),可通过改变加热时长和拉伸速度控制锥形结构的直径和锥角。

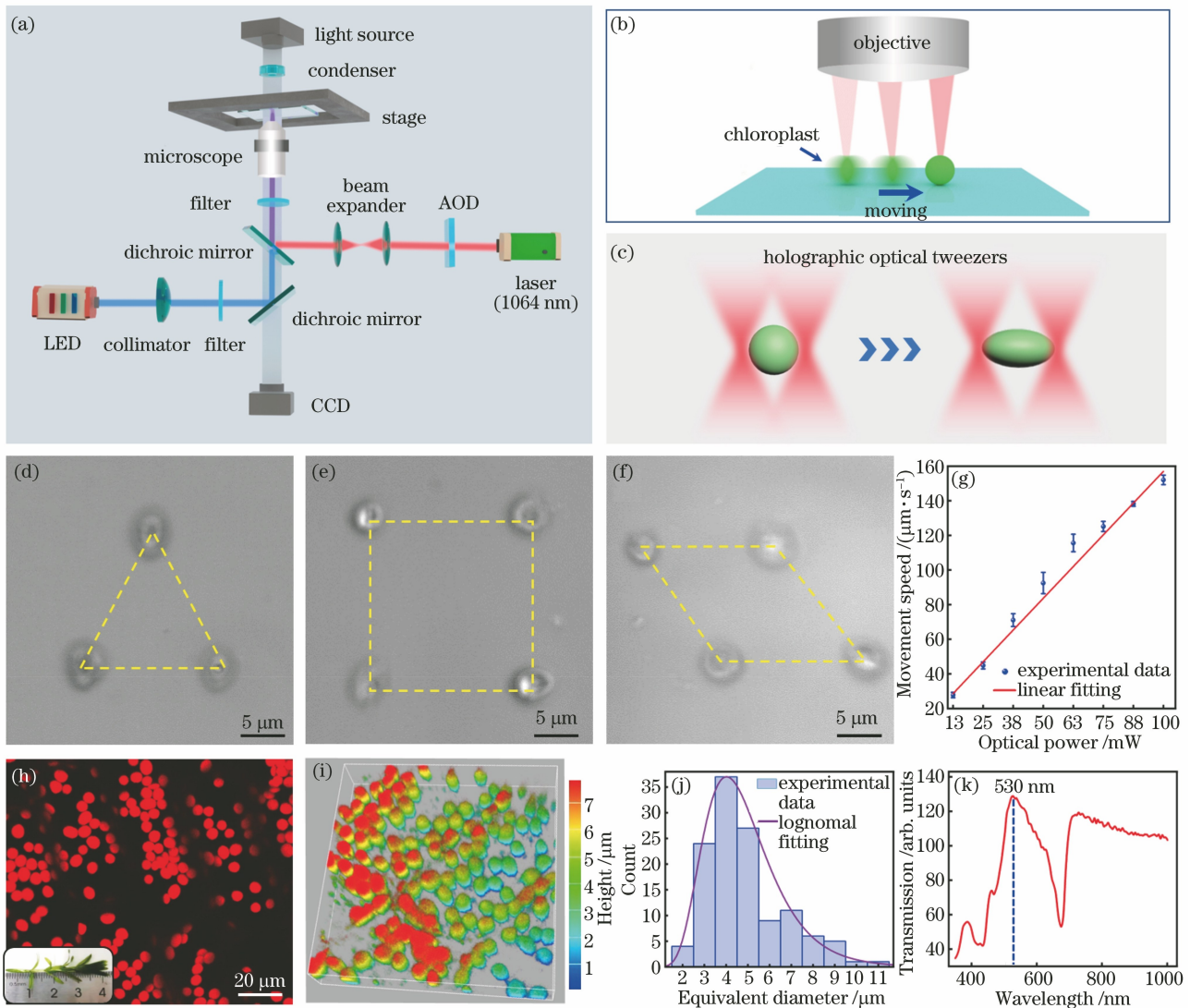


图 1 实验装置与材料表征。(a)光镊系统示意图;(b)光镊移动叶绿体示意图;(c)光镊拉伸叶绿体示意图;(d)~(f)光镊排列叶绿体的显微图片;(g)叶绿体移动速度随光功率的变化;(h)叶绿体的荧光图片,插图为黑藻叶片;(i)叶绿体的三维共聚焦照片;(j)叶绿体的等效直径分布;(k)单个叶绿体的透射光谱

Fig. 1 Experimental setup and material characterization. (a) Schematic diagram of optical tweezers system; (b) schematic diagram of chloroplast movement by optical tweezers; (c) schematic diagram of chloroplast stretching by optical tweezers; (d)–(f) micrographs of chloroplasts arranged by optical tweezers; (g) movement speed of chloroplast varying with optical power; (h) fluorescence image of chloroplasts, inset shows the leaves of *Hydrilla verticillata*; (i) three-dimensional confocal image of chloroplasts; (j) equivalent diameter distribution of chloroplasts; (k) transmission spectrum of single chloroplast

成像实验中使用的样品是红光光盘表面的光栅结构。制备过程:1)用无水乙醇擦拭红光光盘的表面,再裁剪出长为 2 cm,宽为 1 cm 的光盘结构,并除去红光光盘表面的保护膜,将光栅结构裸露在空气中。利用扫描电子显微镜测量得到光盘表面光栅结构的特征尺寸为 200 nm;2)在荧光增强实验中使用发射波长为 520 nm 的量子点作为样品。在 5 μL 量子点溶液中注入 1 mL 去离子水,将稀释后的量子点溶液放置在超声波振荡器中超声振荡 10 min;

3)将量子点溶液滴加到用 75 %无水乙醇擦拭过的载玻片表面上,并在干燥无尘的环境中静止 5 h,随后载玻片上会自组装形成量子点团簇。

2.3 材料表征

实验中所用的叶绿体是从水生植物轮叶黑藻的叶片中提取得到的。由于轮叶黑藻的叶子透明度高,细胞呈单层结构且内含大量的叶绿体,故其是观察和提取叶绿体的典型样本。在荧光显微镜下,叶片中的叶绿体被蓝色波段的光激发,呈红色的自发

荧光,如图1(h)的荧光图片所示。图1(i)展示的是叶片中叶绿体的三维共聚焦荧光图像。可以看出,叶绿体的形状为球形或椭球形。图1(j)的直方图是对100个叶绿体的尺寸进行统计测量,得到叶绿体的平均直径为 $4.8\ \mu\text{m}$ 。图1(k)为单个叶绿体在紫外-可见-近红外的透射光谱,叶绿体透射峰的中心波长为 $530\ \text{nm}$,与后续成像实验中显微镜照明光源的中心波长($560\ \text{nm}$)接近。

3 结果与讨论

3.1 不同形状叶绿体微透镜的聚焦特性

为探究不同形态叶绿体的光聚焦特性,利用双光束光镊捕获叶片内的叶绿体,并沿垂直光轴方向缓慢拉伸叶绿体的一端,使其产生形变,其拉伸过程如图2(a)、(b)所示,图2(b)中的 F 表示光势阱对叶绿体拉伸的力。随着拉伸时间的增加,叶绿体长短轴比 A/B (A 为叶绿体的长轴, B 为叶绿体的短轴)逐渐增大,比值最大为2.7,表明叶绿体具有可控的形变能力,如图2(c)所示。除了可借助高速扫描光镊系统对叶绿体微透镜进行操控外,利用简易的光纤光镊也可以捕获和拉伸叶绿体,实验步骤如下。将控制好的锥形光纤放置在光纤调节架上,用微型注射器将叶绿体悬浮液滴到样品池中,使溶液完全浸没光纤末端。同时,向光纤中通入波长为 $980\ \text{nm}$ 的激光,以将叶绿体捕获在锥形光纤尖端,如图2(d)所示。当叶绿体固定在样品池底部时,利用锥形光纤拉伸叶绿体的一端,可使叶绿体产生形变,如图2(e)所示,其中 F_1 和 F_2 表示拉伸叶绿体的力和将叶绿体固定在样品池底部的力。此外,借助双光纤光镊捕获叶绿体,可以将光纤波导和叶绿体微透镜进行集成,如图2(f)、(g)所示。为了观察叶绿体微透镜的聚焦效果,将粒径为 $50\ \text{nm}$ 的聚苯乙烯(PS)纳米颗粒溶液滴到叶绿体悬浮液中,再将波长为 $637\ \text{nm}$ 的激光通入光纤探针。当可见光通过粒径远小于入射光波长的PS胶体颗粒溶液时产生丁达尔效应,此时溶液中会出现明亮的光路。当利用入射光波照射叶绿体时,由于散射光和透射光的干涉效应,故在叶绿体背后的阴影区域中会产生一个聚焦的光束。对于 A/B 分别为1($A=B=7\ \mu\text{m}$)和1.3($A=9\ \mu\text{m}, B=7\ \mu\text{m}$)的叶绿体微透镜,它们的焦距 L 分别为 $14.8\ \mu\text{m}$ 和 $20.3\ \mu\text{m}$,相应的实验图如图2(h)和2(i)所示。通过COMSOL Multiphysics有限元方法进行相应的数值模拟,其相应的场分布如图2(j)和2(k)所示。模拟得到的

焦距略大于实验得到的焦距,这是因为在模拟中将叶绿体设置成了结构和折射率均匀的球体。在模拟中,将叶绿体的折射率设置为 $1.42^{[35]}$,其周围环境的折射率设置为 1.33 ,将辐射边界的一端设为入射端口,其他边界采用散射边界条件。在入射光波长为 $637\ \text{nm}$ 下,通过一系列的二维有限元模拟,得到了叶绿体微透镜的焦距和半峰全宽(FWHM)与 A/B 的函数关系,如图2(l)所示。在实验中,光镊能够实现的叶绿体长短轴比 A/B 的最大值为2.7,相应的焦距为 $45\ \mu\text{m}$ 。随着叶绿体微透镜长短轴比的增大,焦点沿光传播方向向前移动,相应的焦距与FWHM均增大。

3.2 不同直径的叶绿体微透镜的聚焦特性

相比不同形态的叶绿体微透镜,直径不同的叶绿体所产生的聚光效应也不同。在对不同直径叶绿体微透镜聚焦特性的研究中,将光纤探针放置在距离微透镜 $60\ \mu\text{m}$ 处,分别在直径(D)为 $4.0\ \mu\text{m}$ 和 $9.0\ \mu\text{m}$ 的微透镜中通入波长为 $637\ \text{nm}$ 的激光,在丁达尔效应的作用下,微透镜的焦距分别为 $7.3\ \mu\text{m}$ 和 $19.7\ \mu\text{m}$,聚焦效果如图3(a)和图3(b)所示。接着,改变入射光的波长,在直径为 $9.0\ \mu\text{m}$ 的叶绿体微透镜中通入波长为 $532\ \text{nm}$ 的光束,测量得到其焦距为 $16.6\ \mu\text{m}$,如图3(c)所示。对上述的实验进行相应的模拟,相应的光场分布如图3(d)~(f)所示,相应的焦距分别为 $8.1, 18.3, 16.9\ \mu\text{m}$ 。实验与模拟得到的焦距的误差在合理的误差范围内。在相同的模拟参数下,改变微透镜的直径大小,通过一系列的二维有限元模拟,得到微透镜焦距 L 和FWHM与直径的函数关系,如图3(g)所示。当光照射叶绿体(直径为 $2\sim 11\ \mu\text{m}$)时,由于入射光波长小于叶绿体的尺寸,因此不会出现干涉和衍射现象。一部分光在叶绿体表面会产生散射现象,这是叶绿体表面不完全光滑导致的,对光的聚焦没有产生明显的影响。微球的散射光强集中分布在向前的小角度内,直径越大的叶绿体微透镜,其向前的散射角度越大。同时,微透镜焦斑会延长,微球焦点会逐渐远离微球,FWHM会增大。对于同一直径的叶绿体微透镜,不同的入射波长对其焦距和FWHM的影响也不同,相应的函数关系图如图3(h)所示。不同波长的光在介质中传播的速度不同,其折射率也不同。波长越大,相应的折射率越小,光线折射程度越低。对于相同的叶绿体微透镜,入射波长越大,其散射角越大,相应的焦距与FWHM也越大。

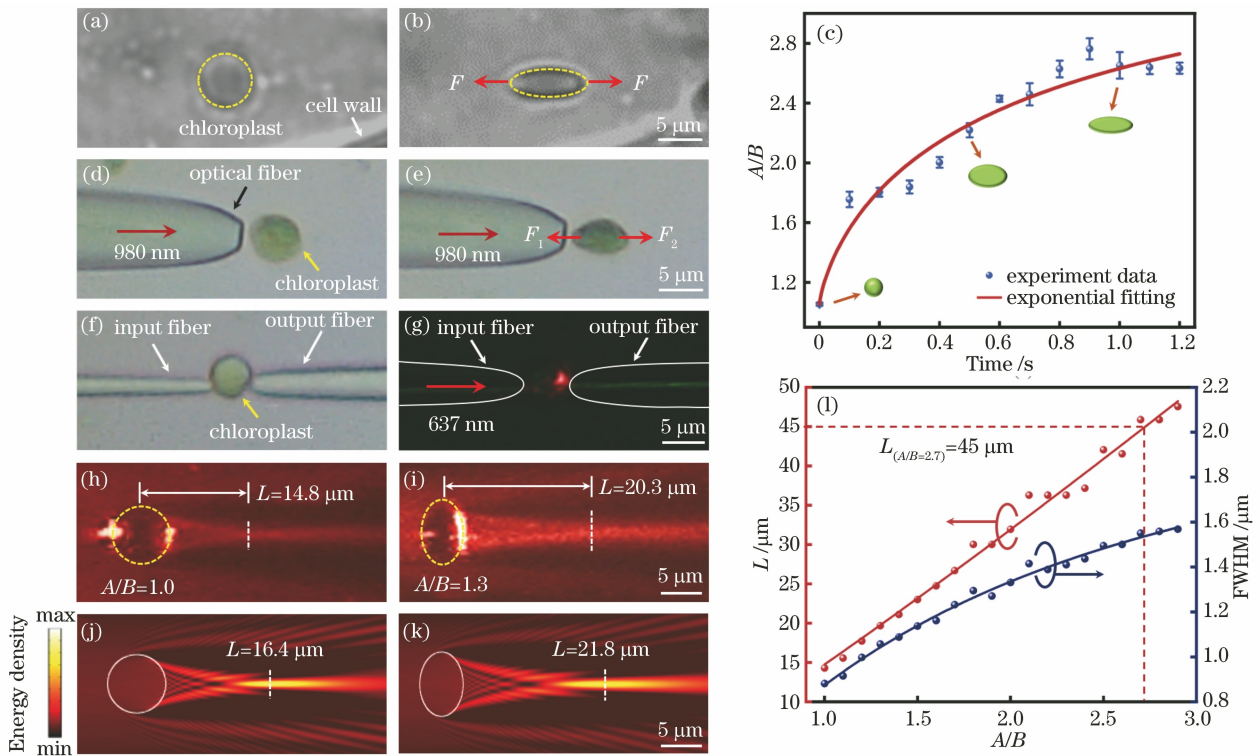


图 2 不同形态叶绿体微透镜的光聚焦。(a)(b)叶绿体的拉伸过程;(c) A/B 随拉伸时间的变化;光纤光镊(d)捕获和(e)拉伸叶绿体的显微图片;(f)(g)光纤波导与叶绿体微透镜的集成;(h)球形和(i)椭圆形的叶绿体光聚焦的实验照片;(j)球形和(k)椭圆形的叶绿体光聚焦的模拟光场分布;(l)叶绿体的焦距和 FWHM 与 A/B 的关系,其中圆点代表模拟数据,实线代表拟合曲线

Fig. 2 Light focusing by chloroplast microlenses with different shapes. (a)(b) Stretching process of chloroplasts; (c) A/B varying with stretching time; micrographs images of chloroplast (d) captured and (e) stretched by optical fiber tweezers; (f)(g) integration of optical fiber waveguide and chloroplast microlens; experimental images of light focusing by (h) spherical and (i) ellipsoidal chloroplast; simulated optical field distribution of light focusing by (j) spherical and (k) ellipsoidal chloroplast; (l) relationship among focal length of chloroplast, FWHM of chloroplast, and A/B , in which dots represent simulated data and solid lines represent fitted curves

3.3 叶绿体微透镜的光学成像

3.1 节和 3.2 节中的实验证明了叶绿体对光具有聚焦能力,为了研究叶绿体微透镜的成像能力,利用叶绿体微透镜对精细结构样品进行成像观察。在实验中,将叶绿体微透镜的悬浮液滴到处理后的红光光盘表面上。图 4 展示了叶绿体微透镜的成像与探测。扫描电子显微镜(SEM)图像显示红光光盘上的光栅结构间距为 200 nm,如图 4(a1)所示。图 4(a2)和图 4(a3)展示了直径为 6 μm 的球形和椭圆形叶绿体对光栅结构的成像。图 4(a3)中的 I 线记录的是无叶绿体条件下光栅结构中凹槽的强度灰度值,II 线为存在叶绿体微透镜条件下光栅结构中凹槽的强度灰度值,它们相应的归一化强度分布图如图 4(a4)所示。经过测量可以得到, I 曲线的 FWHM 为 4.3 μm , II 曲线的 FWHM 为 6.8 μm 。将两曲线的 FWHM 的数值相比,可得到该叶绿体

微透镜的放大倍数(约为 1.6)。在成像实验中,体态小的叶绿体的边缘会出现畸变,畸变的程度随着叶绿体尺寸的增大而降低,也可通过图像处理技术对畸变进行补偿和纠正。叶绿体微透镜的成像原理是叶绿体与成像样品接触,样品表面的微纳结构被叶绿体微透镜放大,再被光学显微镜接收进行二次放大。在近场条件下,包含物体精细结构的倏逝波在微透镜内会转换为传播波,在远场中可以形成清晰放大的图像。

不仅可以利用叶绿体进行体外成像,还可以通过光镊移动叶绿体对植物细胞内的微结构进行成像。叶绿体对细胞内的肌动蛋白丝成像的示意图如图 4(b1)所示。图 4(b2)展示的是黑藻叶片内肌动蛋白丝在光学显微镜下的图像。通过光镊操控技术捕获和移动叶片内的叶绿体,可对肌动蛋白丝进行放大成像,放大成像图如图 4(b3)所示。图 4(b4)记

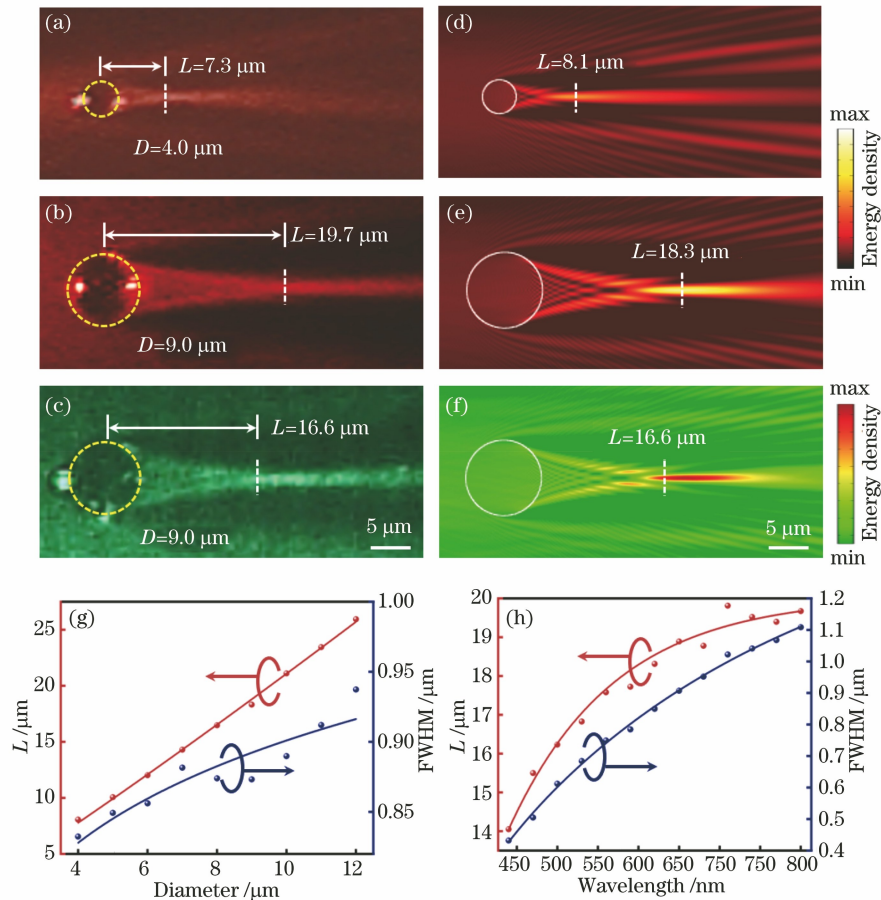


图 3 不同直径叶绿体的光聚焦特性。直径为(a) $4.0 \mu\text{m}$ 和(b) $9.0 \mu\text{m}$ 的叶绿体对波长为 637 nm 光的聚焦;(c) 直径 $9 \mu\text{m}$ 的叶绿体对波长为 532 nm 光的聚焦;(d)~(f)与图 3(a)~(c)对应的叶绿体光聚焦的模拟光场分布;(g)叶绿体的焦距和 FWHM 与直径的关系,其中圆点代表模拟数据,实线代表拟合曲线;(h)叶绿体的焦距和 FWHM 与入射光波长的关系,其中圆点代表模拟数据,实线代表拟合曲线

Fig. 3 Light focusing characteristics of chloroplasts with different diameters. Focus of light with wavelength of 637 nm by chloroplasts with diameter of (a) $4.0 \mu\text{m}$ and (b) $9.0 \mu\text{m}$; (c) focus of light with wavelength of 532 nm by chloroplast with diameter of $9.0 \mu\text{m}$; (d)–(f) simulated optical field distributions of light focusing by chloroplasts corresponding to Figs. 3(a)–(c); (g) relationship among focal length of chloroplast, FWHM of chloroplast, and diameter of chloroplast, in which dots represent simulated data and solid lines represent fitted curves; (h) relationship among focal length of chloroplast, FWHM of chloroplast, and wavelength of incident light, in which dots represent simulated data and solid lines represent fitted curves

录了有叶绿体微透镜和无叶绿体微透镜情况下的肌动蛋白丝的强度分布,其中 w/o Chl 表示无叶绿体条件下的情况, w/t Chl 表示存在叶绿体微透镜条件下的情况。可以发现,在有叶绿体微透镜的情况下,其强度分布比无叶绿体微透镜情况下的强度分布要高,且曲线呈现出两个小峰,表明在叶绿体微透镜的作用下,肌动蛋白丝被放大,更多的细节被观察到,这有望为研究单细胞的移动和收缩等功能提供帮助。

3.4 叶绿体微透镜的荧光信号增强

叶绿体的聚光特性除了可以应用于光学成像领域,其还可以应用于荧光增强领域。在众多的荧光

材料中,量子点具有荧光寿命长、发光稳定性好的优点,是常用的细胞内的荧光探针。本实验利用叶绿体微透镜对量子点进行荧光增强。将发射波长为 520 nm 的量子点自组装在载玻片上,并将叶绿体悬浮液滴到量子点样品上,玻片上的量子点被光学显微镜中的蓝光激发,激发光通过叶绿体后产生的局域光斑可使电场强度得到增强,进而可提高荧光的激发效率,其荧光增强示意图如 4(c1) 所示。利用光镊将直径为 $4.5 \mu\text{m}$ 和 $9.0 \mu\text{m}$ 的叶绿体微透镜 (Chl A 和 Chl B) 分别移动到量子点的上方,量子点被蓝光激发,荧光信号得到增强,如图 4(c2) 和图 4(c3) 所示,此时增强倍数的关系图如图 4(c4) 所示。

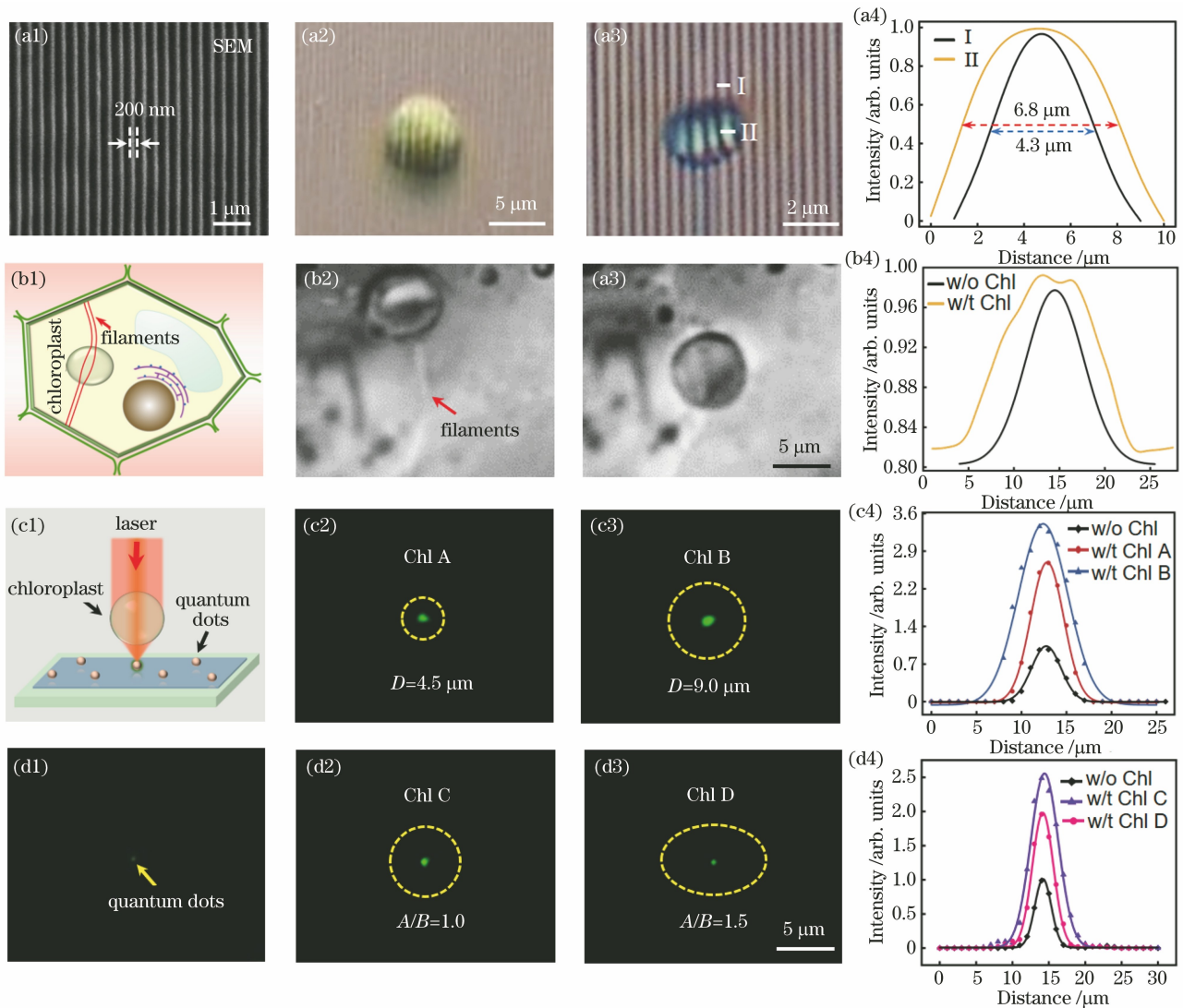


图 4 叶绿体微透镜的成像与探测。(a1)光盘光栅的 SEM 图;(a2)球形和(a3)椭球形的叶绿体对光栅的成像;(a4)图 4(a3)的肌动蛋白丝强度分布;(b1)叶绿体对胞内肌动蛋白丝的成像示意图;(b2)(b3)叶绿体微透镜对植物细胞内肌动蛋白丝的成像过程;(b4)有无叶绿体的植物肌动蛋白丝强度分布;(c1)叶绿体对量子点荧光增强的示意图;直径为(c2) $4.5 \mu\text{m}$ 和(c3) $9.0 \mu\text{m}$ 的叶绿体微透镜对量子点的荧光增强;(c4)图 4(c2)、(c3)中荧光增强的关系图;(d1)无叶绿体情况下量子点的荧光图像; A/B 分别为(d2) 1.0 和(d3) 1.5 的叶绿体对量子点的荧光增强;(d4)图 4(d1)~(d4)中荧光增强的关系图

Fig. 4 Optical imaging and detection by chloroplast microlenses. (a1) SEM image of disk grating; images of gratings by (a2) spherical and (a3) ellipsoid chloroplast microlenses; (a4) actin filament strength distribution of Fig. 4(a3); (b1) schematic diagram of imaging of intracellular actin filaments by chloroplast; (b2)(b3) imaging process of actin filaments in plant cells by chloroplast microlenses; (b4) intensity distributions of plant actin filaments with and without chloroplasts; (c1) schematic diagram of fluorescence enhancement of quantum dots by chloroplasts; fluorescence enhancement of quantum dots by chloroplast microlenses with diameters of (c2) $4.5 \mu\text{m}$ and (c3) $9.0 \mu\text{m}$; (c4) relationship diagram of fluorescence enhancement in Figs. 4(c2) and (c3); (d1) fluorescence image of quantum dots without chloroplasts; fluorescence enhancement of quantum dots by chloroplasts with A/B of (d2) 1.0 and (d3) 1.5; (d4) relationship diagram of fluorescence enhancement in Figs. 4(d1)~(d3)

可以发现,荧光增强倍数分别为 2.6 和 3.3,对于直径越大的微透镜,其荧光增强倍数越大。对于不同形态的叶绿体微透镜,其对量子点荧光的影响也不

同。在没有微透镜的情况下,量子点的荧光信号微弱,如图 4(d1)所示。将球形的叶绿体微透镜(Chl C)放置在量子点上,并将其沿垂直方向移动,相应

的荧光图像如图 4(d2)所示。利用光镊对该微透镜拉伸,使其 A/B 变为 1.5($A=9\ \mu\text{m}$, $B=6\ \mu\text{m}$)的叶绿体微透镜(Chl D),并对量子点进行荧光成像,如图 4(d3)所示,此时荧光增强倍数关系图如图 4(d4)所示。可以发现,荧光增强倍数分别为 2.5 和 2.0,表明球形叶绿体微透镜具有较强的信号收集能力。

3.5 叶绿体微透镜的数值模拟

叶绿体微透镜收集和增强信号的原理可以通过模拟计算来进行研究。该模拟使用基于有限元积分的 COMSOL Multiphysics 软件。在模型中,设置背景介质是折射率 n 为 1.33 的水溶液,使用电磁波中的点光源模拟量子点荧光,并设其为坐标原点,发射波长为 470 nm。叶绿体微透镜折射率为 1.42,其在点光源下方 100 nm 距离处。在荧光收集过程中,使用显微镜水镜,其数值孔径 NA 为 1,水环境

的折射率 n 为 1.33。由公式 $NA=n \cdot \sin \vartheta$,其中 ϑ 为孔径半角,可计算出 α 为 49° ,物镜收集角 2α 为 98° 。在无透镜的情况下,点光源的光场分布图如图 5(a1)所示,其相应的发散角分布图如图 5(b1)所示。通过测量得到,在无微透镜的情况下,其发散角 β 为 180° ,大于物镜收集角 98° ,故在无透镜的情况下较难收集荧光信号。接着,在点光源下方 100 nm 处分别设置直径为 $3.0\ \mu\text{m}$ 和 $7.0\ \mu\text{m}$ 的微透镜,在激发过程中,激发光和微透镜相互作用使样品位置的局域电场得到增强,激发出的荧光信号会向目镜方向会聚,进而实现了荧光收集效率的提高,此时的光场分布图分别如图 5(a2)和图 5(a3)所示,相应的极坐标图如图 5(b2)和图 5(b3)所示,收集角分别为 77° 和 88° 。直径较小的叶绿体微透镜的发散角小,荧光信号更容易被收集。在相同的模型下,将图 5(a3)中微透镜的 A/B 从 1.0($A=B=7.0\ \mu\text{m}$)更

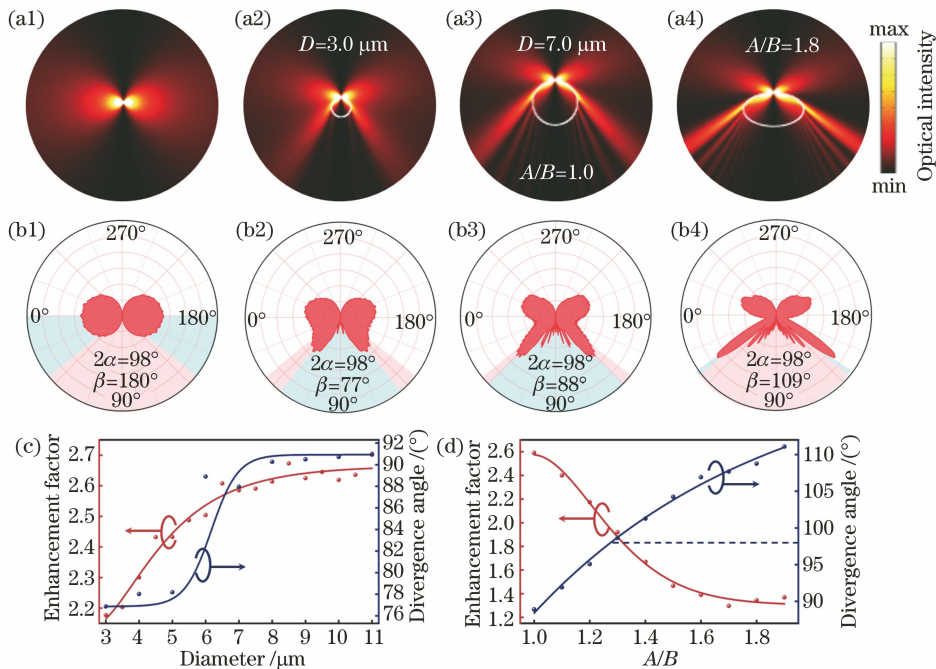


图 5 叶绿体微透镜增强量子点荧光的数值模拟。(a1)无微透镜的光场分布图;直径为(a2) $3.0\ \mu\text{m}$ 和(a3) $7.0\ \mu\text{m}$ 的微透镜的荧光增强模拟;(a4) A/B 为 1.8 的微透镜的荧光增强模拟;(b1)~(b4)图 5(a1)~(a4)相对应的极坐标图;(c)叶绿体微透镜的增强倍数和发散角与直径的关系,其中圆点代表模拟数据,实线代表拟合曲线;(d)叶绿体微透镜的增强倍数和发散角与 A/B 的关系,其中圆点代表模拟数据,实线代表拟合曲线

Fig. 5 Numerical simulation of fluorescence enhancement of quantum dots by chloroplast microlenses. (a1) optical field distribution diagram without microlens; fluorescence enhancement simulation of microlenses with diameter of (a2) $3.0\ \mu\text{m}$ and (a3) $7.0\ \mu\text{m}$; (a4) fluorescence enhancement simulation of microlens with $A/B=1.8$; (b1)~(b4) polar coordinate diagrams corresponding to Figs. 5(a1)~(a4); (c) relationship among enhancement factor of chloroplast microlens, divergence angle of chloroplast microlens, and diameter, in which dots represent simulated data and solid lines represent fitted curves; (d) relationship among enhancement factor of chloroplast microlens, divergence angle of chloroplast microlens, and A/B , in which dots represent simulated data and solid lines represent fitted curves

换为 $1.8(A=9.4\ \mu\text{m}, B=5.2\ \mu\text{m})$, 其相应的电场分布图如 5(a4) 所示, 相应的极坐标如图 5(b4) 所示, 相应的发散角为 109° 。发射过程中荧光收集效率增强的计算公式^[36]为

$$\varphi = \frac{I_S}{I_{\text{rad}}} / \frac{I_{S,0}}{I_{\text{rad}}}, \quad (1)$$

式中: $I_{S,0}$ 表示量子点的荧光直接辐射到收集面上的光强; I_S 表示量子点的荧光经过微透镜后辐射到收集面上的光强; I_{rad} 表示量子点在辐射场中的总光强。

根据(1)式和相应的极坐标辐射分布图, 可计算出不同直径的叶绿体微透镜的荧光收集效率和发散角的大小, 其关系图如图 5(c)。可以看出, 随着微透镜直径的增大, 其荧光收集效率的增强倍数在逐渐增大, 并且发散角也在逐渐增大。当叶绿体直径为 $11\ \mu\text{m}$ 时, 其发散角为 91° , 小于物镜收集角 98° , 故利用球形叶绿体可以有效收集和增强荧光信号。对于不同长短轴比的叶绿体微透镜, 根据(1)式和相应的极坐标辐射分布图, 可得到其荧光收集情况, 函数关系图如图 5(d) 所示。对于 A/B 越大的微透镜, 其荧光增强倍数越小, 相应的发散角越大, 表明椭球形的叶绿体微透镜较难收集荧光信号。

4 结 论

利用光镊操控技术并结合丁达尔效应, 发现了细胞内叶绿体的聚光特性, 并将其应用于纳米结构成像和荧光信号增强。实验结果显示, 叶绿体微透镜的聚焦光斑大小和焦距与叶绿体的形状和尺寸有关。利用双光束光镊对叶绿体进行拉伸, 可以灵活地调节叶绿体微透镜的焦距 ($15\sim 45\ \mu\text{m}$)。利用光镊捕获和移动叶绿体微透镜, 可对光盘表面的纳米光栅结构、植物细胞内的肌动蛋白丝进行放大成像, 成像精度为 $200\ \text{nm}$ 。此外, 利用叶绿体微透镜还可以有效地增强量子点的荧光信号, 进而可实现对微弱荧光信号的探测。

相对目前报道的固体微透镜, 该研究使用的叶绿体微透镜具有制备简单、不需要化学合成、生物兼容和环境友好等优点。在实验中, 利用光镊技术可非接触、无损伤地捕获和拉伸叶绿体, 提高了叶绿体微透镜在光学成像和探测应用中的灵活度, 在监测细胞内部的动态过程和生理活动等方面展现出了潜力。此外, 叶绿体微透镜的研究思路, 还可以拓展到其他的天然生物材料上, 例如球形细胞、脂质液滴等, 为单细胞成像和探测提供了新的思路和方法。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Chen C F, Zheng Y, Fang C L. Improvement of luminescence efficiency and stability of CsPbBr₃ quantum dot films with microlens array structure [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(13): 1313001. 陈长锋, 郑懿, 方朝龙. 微透镜阵列结构膜提高 CsPbBr₃ 量子点薄膜发光效率及其稳定性 [J]. *中国激光*, 2021, 48(13): 1313001.
- [3] 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.
- [4] Yang F F, Li H, Peng J, et al. Research on microscopic imaging of high resolution light field based on graph regularization [J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(9): 0918001. 杨飞凡, 李晖, 彭晶, 等. 基于图正则化的高分辨率光场显微成像研究 [J]. *光学学报*, 2021, 41(9): 0918001.
- [5] Li Y C, Xin H B, Lei H X, et al. Manipulation and detection of single nanoparticles and biomolecules by a photonic nanojet [J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5(12): e16176.
- [6] 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.
- [7] Liu C, Wang D, Wang Q H, et al. Multifunctional optofluidic lens with beam steering [J]. *Optics Express*, 2020, 28(5): 7734-7745.
- [8] Zhang Y, Zhang X, Shi G W, et al. Applications of liquid lenses in zoom systems [J]. *Chinese Optics*, 2013, 6(1): 46-56. 张鹰, 张新, 史广维, 等. 液体透镜在变焦系统中的应用 [J]. *中国光学*, 2013, 6(1): 46-56.
- [9] Kim J, Kim J, Na J H, et al. Liquid crystal-based square lens array with tunable focal length [J]. *Optics Express*, 2014, 22(3): 3316-3324. [PubMed]
- [10] Liu P H, Li S Y, Wang W W, et al. Preparation and properties of flexible liquid crystal micro-lens arrays [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2021, 50(3): 0323001. 刘鹏辉, 李诗尧, 王文雯, 等. 柔性液晶微透镜阵列的制备与性能研究 [J]. *光子学报*, 2021, 50(3): 0323001.
- [11] 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.
- [12] Lombardini A, Mytskaniuk V, Sivankutty S, et al. High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope[J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7: 10.
- [13] Bogucki A, Zinkiewicz Ł, Grzeszczyk M, et al. Ultra-long-working-distance spectroscopy of single nanostructures with aspherical solid immersion microlenses [J]. *Light: Science & Applications*, 2020, 9: 48.
- [14] Xu S, Liu Y F, Ren H W, et al. A novel adaptive mechanical-wetting lens for visible and near infrared imaging[J]. *Optics Express*, 2010, 18(12): 12430-12435.
- [15] Ren H W, Fox D, Anderson P A, et al. Tunable-focus liquid lens controlled using a servo motor[J]. *Optics Express*, 2006, 14(18): 8031-8036.
- [16] Tong W, Tang X G, Liao J K, et al. Design and analysis for thermal actuated tunable polymer microlens [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(4): 042202.
童伟, 唐雄贵, 廖进昆, 等. 热调控变焦聚合物微透镜的设计与分析[J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(4): 042202.
- [17] Malyuk A Y, Ivanova N A. Varifocal liquid lens actuated by laser-induced thermal Marangoni forces [J]. *Applied Physics Letters*, 2018, 112(10): 103701.
- [18] Li C H, Jiang H R. Electrowetting-driven variable-focus microlens on flexible surfaces [J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 100(23): 231105-2311054.
- [19] Li L, Wang J H, Wang Q H, et al. Displaceable and focus-tunable electrowetting optofluidic lens [J]. *Optics Express*, 2018, 26(20): 25839-25848.
- [20] Li Y C, Liu X S, Li B J. Single-cell biomagnifier for optical nanoscopes and nanotweezers [J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8: 61.
- [21] Li Y C, Xin H B, Zhang Y, et al. Living nanospear for near-field optical probing[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 10703-10711.
- [22] Pan T, Lu D Y, Xin H B, et al. Biophotonic probes for bio-detection and imaging[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10(1): 124.
- [23] Schuergers N, Lenn T, Kampmann R, et al. Cyanobacteria use micro-optics to sense light direction [J]. *eLife*, 2016, 5: e12620.
- [24] Toomey M B, Corbo J C. Evolution, development and function of vertebrate cone oil droplets [J]. *Frontiers in Neural Circuits*, 2017, 11: 97.
- [25] Picioreanu C, Blauert F, Horn H, et al. Determination of mechanical properties of biofilms by modelling the deformation measured using optical coherence tomography [J]. *Water Research*, 2018, 145: 588-598.
- [26] Barns S, Balanant M A, Sauret E, et al. Investigation of red blood cell mechanical properties using AFM indentation and coarse-grained particle method[J]. *Biomedical Engineering Online*, 2017, 16: 140.
- [27] Shojaei-Baghini E, Zheng Y, Sun Y. Automated micropipette aspiration of single cells[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2013, 41(6): 1208-1216.
- [28] Dao M, Lim C T, Suresh S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers [J]. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 2003, 51(11/12): 2259-2280.
- [29] Ashkin A, Dziedzic J M, Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams[J]. *Nature*, 1987, 330(6150): 769-771.
- [30] Li B J, Xin H B, Zhang Y, et al. Progress of optical trapping and manipulation [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(9): 0900126.
李宝军, 辛洪宝, 张焱, 等. 光捕获和光操控研究进展[J]. *光学学报*, 2011, 31(9): 0900126.
- [31] Liang Y S, Yao B L, Lei M. Applications of holographic optical tweezers in biological research[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207020.
梁言生, 姚保利, 雷铭. 全息光镊在生物学研究中的应用[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207020.
- [32] Rancourt-Grenier S, Wei M T, Bai J J, et al. Dynamic deformation of red blood cell in dual-trap optical tweezers[J]. *Optics Express*, 2010, 18(10): 10462-10472.
- [33] Kress H, Park J G, Mejean C O, et al. Cell stimulation with optically manipulated microsources [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(12): 905-909.
- [34] Dholakia K, Čizmár T. Shaping the future of manipulation[J]. *Nature Photonics*, 2011, 5(6): 335-342.
- [35] Berdnik V V, Mukhamedyarov R D. Radiative transfer in plant leaves[J]. *Optics and Spectroscopy*, 2001, 90(4): 580-591.
- [36] 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.