

doi: 10.3788/gzxb20144306.0611001

基于狭缝扫描的表面等离子体共振成像

高来勋¹, 李松权¹, 叶红安¹, 刘书钢¹, 蒋式弘², 柳春郁¹, 安旭¹

(1 黑龙江大学 电子工程学院 黑龙江省普通高等学校电子工程重点实验室, 哈尔滨 150080)

(2 圣安德鲁斯大学 物理系, 圣安德鲁斯, KY16 9SS)

摘要:利用表面等离子体共振技术进行电介质样品成像研究. 采用高数值孔径显微物镜作为耦合元件, 632.8 nm He-Ne 激光会聚激发金膜产生表面等离子体共振, 通过狭缝光阑限制光束入射角, 对金膜上的氮化硅光栅进行成像. 反射光由放置在样品像方共轭面上的 CCD 摄像机接收, 获得样品的表面等离子体共振像. 通过扫描移动狭缝, 得到入射角从 44° 至 54° 的扫描样品图像, 从图像中提取样品各点的表面等离子体共振曲线, 由计算机重构出样品的表面等离子体共振角谱灰度图.

关键词:物理光学; 表面等离子体共振; 表面等离子体共振成像; 显微物镜

中图分类号: TN247

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2014)06-0611001-5

Surface Plasmon Resonance Imaging Based on Slit Scanning

GAO Lai-xu¹, LI Song-quan¹, YE Hong-an¹, LIU Shu-gang¹,

JIANG Shi-hong², LIU Chun-yu¹, AN Xu¹

(1 School of Electronic Engineering, The Key Laboratory of Electronics Engineering, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

(2 University of St Andrews, Department of Physics and Astronomy, St Andrews KY16 9SS, UK)

Abstract: The surface plasmon resonance technique was used for imaging of the dielectric sample. Based on a large numerical aperture microscope objective configuration, a light beam from a He-Ne laser ($\lambda = 632.8$ nm) was converged to excite surface plasmon resonance on gold film. The image of Si_3N_4 grating on the gold film was acquired by using a slit which restricts the incident angle of imaging beam. CCD was placed to detect the reflected light and get the surface plasmon resonance image of the sample at the conjugate plane of the sample. The images of sample was obtained at incident angles from 44° to 54° via scanning of the slit. The surface plasmon resonance curves of each point of the sample was extracted from this set of images. Grayscale image of resonance angular spectra of sample was reconstructed by computer simultaneously using the resonance angles corresponding to each point of sample.

Key words: Physical optics; Surface Plasmon Resonance (SPR); Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI); Microscope objective

OCIS Codes: 260.0260; 240.6680; 110.0180; 260.5740

0 引言

表面等离子体共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 是一种物理光学现象, 利用光波在电介质和金属薄膜界面处发生全内反射时的消逝波, 引发金属表面的自由电子产生表面等离子体波 (Surface Plasmon

Wave, SPW)^[1]. 表面等离子体波沿金属和电介质的边界传播, 对金属外电介质的介电常量变化非常敏感, 这种特性意味着 SPR 有很多传感应用. 1982 年, Nylander、Liedberg 等人将 SPR 技术应用于生物传感器, 研究 IgG 抗体与抗原相互作用^[2-3]. 他将基于 SPR 的传感器应用于监测生物分子作用, 首次使用生物分

基金项目: 黑龙江省教育厅海外学人项目 (No. 1251HD2002)、国家自然科学基金 (No. 61177079)、国家青年自然科学基金 (No. 61205071)、黑龙江省自然科学基金重点项目 (No. ZD201103) 和黑龙江大学青年科学基金 (No. Q200820) 资助

第一作者: 高来勋 (1979-), 男, 讲师, 硕士, 主要研究方向为表面等离子体共振技术. Email: gaolaixu@hlju.edu.cn

导师: 叶红安 (1950-2013), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为光纤传感技术、光电检测技术. Email: yehongan@hlju.edu.cn

通讯作者: 刘书钢 (1956-), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为表面等离子体共振成像技术. Email: @liushugang@hlju.edu.cn

收稿日期: 2014-02-21; **录用日期:** 2014-04-11

<http://www.photon.ac.cn>

子免标记、实时检测的物理方法. 由于 SPR 具有无需对分子进行标记、能实时检测分子相互作用全过程等优点, 成为生命科学和制药研究中的一种重要工具^[4]. 但 SPR 本质上是单通道分析技术, 不能解决 20 世纪 90 年代后迅速发展起来的功能基因组学、蛋白质组学、代谢组学等各种组学所需求的高通量、大范围生命物质分析问题. 因此, 发展灵敏快速的高通量分析新方法以便能有效处理含有海量成分但含量差异悬殊的组学样品, 成为迫在眉睫的挑战. 1988 年, Nature 报道了表面等离子体共振显微方法^[5]. 表面等离子体共振成像方法 (Surface Plasmon Resonance Imaging, SPRI) 具有与 SPR 相同的优势, 如样品免标记、可原位实时测定分子相互作用等, 但其分析通量大幅提升^[6-8]. 测定范围不是一个点, 而是一个小面积. 结合微点阵 (或芯片) 技术, SPRI 技术可同时、原位、实时观测成千上万个无标记样点及识别其与其他分子的作用, 特别适合于高通量筛选和动力学分析.

国内外大多数实验室都是采用棱镜激发 SPR 方式来建立成像系统, 用于生物检测方面的研究^[9-13]. 由于棱镜结构的 SPRI 分辨率受等离子体波传播长度限制, 无法分辨平行入射面且样品斑点直径小于等离子体波传播长度的样点^[14-15]. 1998 年日本学者 Kano 提出了使用大相对孔径显微物镜实现激发 SPR^[16], 为提高空间分辨率达到衍射极限提供了一种可行方法, 为新一代高分辨率 SPRI 仪器做了基础研究. 英国 Nottingham 大学光学工程组在 SPR 生物成像显微镜研究领域成功采用高数值孔径显微物镜激发 SPR, 使分辨率高于使用棱镜激发的 SPR^[17-18].

本文用高数值孔径 (NA=1.49) 显微物镜作为耦合结构来激发 SPR, 以 Si₃N₄ 光栅 (厚度仅为 20 nm) 作为实验样品进行成像. 用 SPRI 方法进行分析研究, 以狭缝作为光阑, 限制激光在金膜表面激发 SPR 的入射角, 由 CCD 摄像机接收反射光得到清晰的样品像. 通过狭缝扫描, 得到对应不同入射角度的样品图像, 并提取出样品各点的表面等离子体共振曲线.

1 SPRI 基本原理

以棱镜/金属膜/空气三层 Kretschmann 结构为例, 如图 1. 将一束 P 偏振平行光, 通过棱镜以一定入

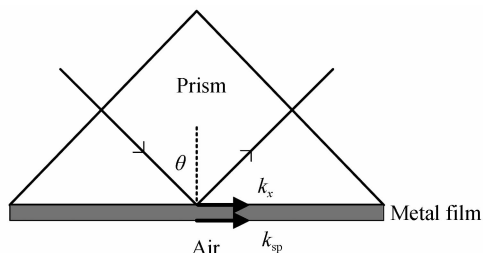


图 1 Kretschmann 结构原理
Fig. 1 Schematic of Kretschmann configuration

射角照射到金属膜上, 利用光在玻璃界面处发生全内反射时的倏逝波, 引发金属膜表面的自由电子产生表面等离子体波.

当入射光波矢在水平方向上的分量 k_x 与表面等离子体波波矢 k_{sp} 匹配时, 即满足共振条件 $k_x = \text{Re}(k_{sp})$ 时, 产生吸收现象. 其中

$$k_x = \sqrt{\epsilon_0} (\omega/c) \sin \theta \quad (1)$$

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \right)^{1/2} \quad (2)$$

式中 ϵ_0 是传输介质介电常量, ω 为角频率, c 为真空中光速, θ 是入射角, ϵ_1 ($\epsilon_1 = \epsilon_1' + i\epsilon_1''$)、 ϵ_2 分别为金属和金属膜外介质的介电常量.

在金属膜材料已知的情况下, 该共振角与膜表面的样品折射率密切相关. 附着的样品不同, 折射率不同, 所对应的共振角度也就不同. 同样, 根据菲涅耳 (Fresnel) 公式可以计算出不同折射率的样品对应的不同反射率^[19].

$$R_P = |r_{012P}|^2 = \left| \frac{r_{01P} + r_{12P} e^{2ik_3d}}{1 + r_{01P} r_{12P} e^{2ik_3d}} \right|^2 \quad (3)$$

式(3)为三层结构 P 偏振光的反射率公式, r_{012} 为三层结构的反射系数, r_{01} 为 0 层和 1 层两个介质界面处的反射系数, r_{12} 为 1 层和 2 层两个介质界面处的反射系数, k_{z1} 为第 1 层光波矢在垂直于界面方向上的分量, d 为金属膜厚度. 因此, 一束光以某角度入射到成像芯片上激发 SPR 后, 从棱镜另一侧接收到的反射光的强度分布则代表着被照射样品区域的折射率分布.

对于显微物镜结构的 SPRI 系统, 其成像原理相同. 只是通过增加光阑限制光束入射的角度, 在成像芯片上激发 SPR 后, 放置 CCD 相机接收反射光, 对金属膜表面样品成像. 由于样品存在折射率分布差异, 不同的折射率对应不同的 SPR 角, 即在同一入射角度下对应不同的反射率. 对于在金膜表面制备的 Si₃N₄ 光栅样品, 相当于 Si₃N₄ 和栅间介质 (空气) 这两种介质折射率周期排列, 并对应各自的 SPR 曲线, 如图 2. 当光束以入射角 θ_1 照射到光栅样品时, 对应光栅间隙 (Au/

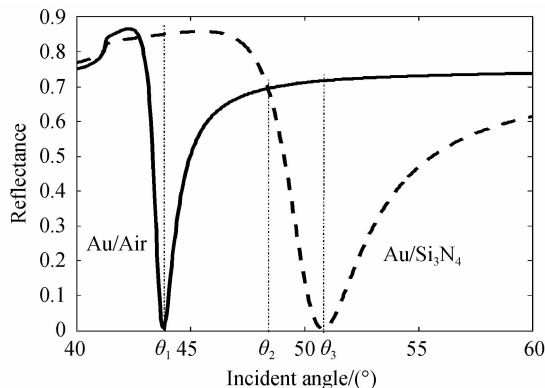


图 2 金/空气和金/氮化硅的 SPR 角度曲线
Fig. 2 SPR curves for Au/Air and Au/Si₃N₄

Air)处的 SPR 曲线,反射率达到最小值,呈现暗区;而此入射角下光栅处(Au/Si₃N₄)的 SPR 曲线,反射率位于高值,即呈现亮区,在 CCD 上则显现出明暗相间的光栅图像.当入射角为 θ_3 时,情况与之相反,图像与入射角 θ_1 时的光栅图像明暗区域相反.入射光线从 θ_1 变化到 θ_3 过程中,光栅的明暗区域对比是逐渐变化的.当入射角为 θ_2 时,两种介质对应的反射率相同,即光栅图像的明暗分布不明显.

2 实验及测量结果

2.1 实验结构

实验中以 Nikon MRD01691 型油浸显微物镜 (NA=1.49) 作为耦合元件,成像芯片为表面镀制 50 nm 金膜的盖玻片,以金膜表面上制备的 Si₃N₄ 光栅 (Si₃N₄ 厚度 20 nm,宽度 6 μm ,栅距 2 μm) 作为标准样品.将盖玻片玻璃一面通过折射率为 1.515 的折射率匹配液粘合在物镜表面构成入射光的传输介质.成像芯片由一个夹具夹持,可进行三维微位移移动.

实验光路如图 3. He-Ne 激光光源波长为 632.8 nm,漫射器为可高速旋转的毛玻璃薄片,放置在物镜后焦面的共轭面上,其作用是使激光束出射经漫射器后形成散射光斑,使物镜后焦面上的光照强度均匀,并且有一定的散射角度,可以在样品形成一定面积的光照区域.用水平狭缝作为光阑,狭缝位置位于显微物镜后焦面的共轭面上,可在垂直光轴方向上微移,由此狭缝来限定物镜后焦面光线照射到成像芯片上的入射角.经透镜组和狭缝后入射到物镜中在成像芯片金膜上激发 SPR.

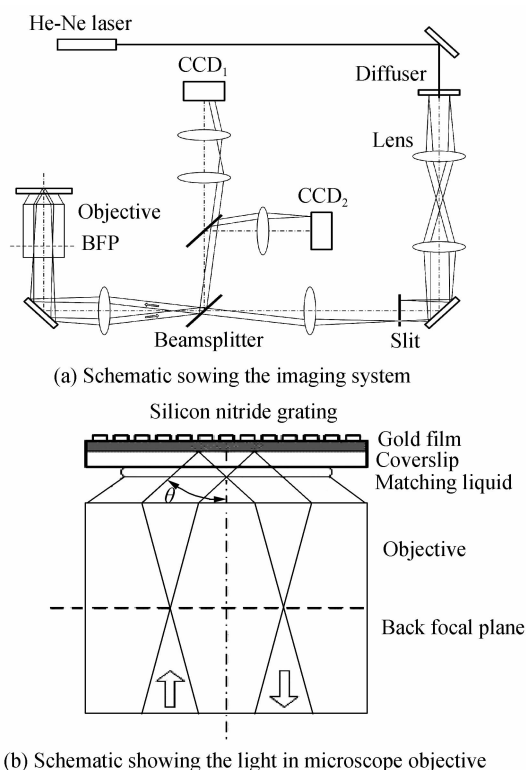


图 3 实验系统光路

Fig. 3 Schematic showing the optical system

反射光经分光镜分别由两个 edmund CCD 相机 (Basler A641f, pixel size 4.4 $\mu\text{m} \times 4.4 \mu\text{m}$), 接收. CCD₁ 相机所放位置使传感器平面与样品平面共轭,用来对样品成像. CCD₂ 相机的传感器平面与物镜后焦面共轭,用来对物镜后焦面成像.狭缝移动平面与物镜后焦面共轭,狭缝的位置限定了后焦面上光线的位置,即限定了光束入射角 θ .狭缝由光轴沿垂轴方向移动时,对应于入射角度则由小向大变化,实现了角度扫描.随着狭缝的移动,可以实时地获取样品图像并保存.每一帧图像则对应着某一个入射角,图像中的灰度值则对应于反射光强.提取各帧样品图像中同一点的灰度值并归一化,即可得到该点的 SPR 数据曲线.对图像中各个像素点进行 SPR 数据提取,得到该点的共振角数据,这样可以获得一张样品的共振角谱图.

2.2 实验结果及分析

2.2.1 样品的 SPR 像

首先,去掉狭缝光阑,调整光路,使 He-Ne 激光在成像芯片上激发 SPR,同时在 CCD₂ 相机上观察显微物镜后焦面的图像.通过 PI 公司的纳米移动台调整成像芯片位置使后焦面图像清晰,如图 4.由于入射光偏振方向为竖直方向,图像中形成了两个相对的暗弧^[20].P 偏振光在水平方向上的分量为 0,所以水平方向没有激发 SPR,没有产生暗弧.从竖直方向到水平方向之间,随着 P 偏振分量的变化,产生了不同程度的 SPR 吸收,暗弧在趋近水平方向上逐渐淡化消失.后焦面圆半径对应于光束的入射角,待测介质不同,暗弧的半径也发生变化.

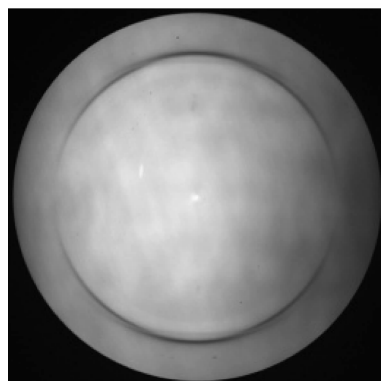


图 4 CCD₂ 相机采集的物镜后焦面图像

Fig. 4 Experimental back focal plane distributions detected by CCD₂ for the objective

然后,在后焦面的共轭面上放置水平狭缝光阑,由中心沿竖直方向移动扫描,即实现光束入射角度扫描.狭缝在移动到暗弧附近时,可以由 CCD₁ 获得样品的图像.狭缝的移动使得入射角由小及大变化,图像的明暗对比也会逐渐变化,同时保存入射角变化时的样品图像.图 5 展示了不同入射角时的样品图像.

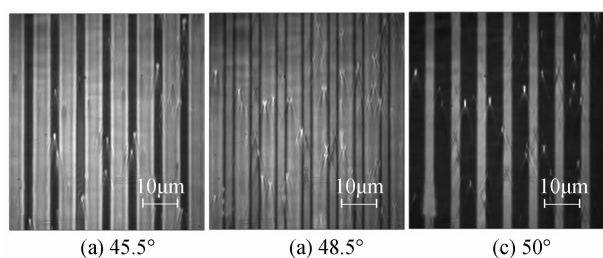


图5 不同入射角时的样品图像

Fig. 5 Sample image corresponding to different incident angle

图像中的灰度值对应着反射光强,图像的明暗分布代表着样品的折射率分布,样品上沾有的灰尘改变了该点的折射率,在图像中形成了一些微小的白点.随着入射角的变化,图像的明暗分布也发生了变化.在图5(a)中,亮条纹表示样品中的光栅;图5(c)中反射率发生反转,暗条纹表示光栅;图5(b)反射率相同,明暗对比不明显.由于图像的对比度取决于同一入射角下两种介质的反射率差,反射率的波动会对成像清晰度带来影响.实验中可以选择合适角度的、清晰的样品SPR图像进行研究.若将生物、化学类样品制成阵列,以此方法可以用于对生物、化学类样品进行成像与相互作用的高通量分析.

2.2.2 样品的SPR数据提取

通过全反射的方法对后焦面进行角度标定.狭缝沿垂轴方向的竖直移动实现光束入射角从 44° 至 54° 扫描,在此角度扫描范围内共获取230帧图像.指针对样品各点,提取每帧图片中同一位置点对应的灰度值,并将灰度值归一化,可以绘制出角度-灰度曲线,如图6.

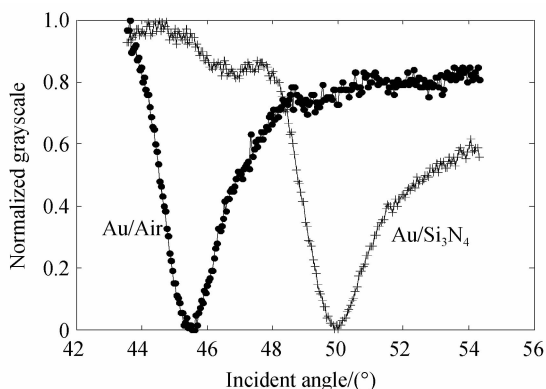


图6 样品中金/空气和金/氮化硅的SPR实验曲线

Fig. 6 Experimental data points extracted from the Au/Air and the Au/Si₃N₄ strips

可以看到,空隙处和Si₃N₄光栅的SPR曲线.比较接近理论值,由于金膜、Si₃N₄膜的厚度及介电常量对共振角度及吸收峰宽度的影响比较大,给实验结果带来一些误差.

在对样品成像的同时,通过狭缝的一维移动,得到了样品各点的SPR数据曲线,实现了高通量的SPR角度扫描.另外,也避免了通常SPR角度调制过程中所

必需的转角装置和光接收方的角度跟随装置,增强了检测稳定性,降低了机械误差,提高了检测效率.对高通量生物化学样品的综合检测方面有着积极的意义.

2.2.3 样品SPR角谱图

依据提取出的样品SPR数据曲线,通过计算机获得样品各点SPR曲线吸收峰最小值对应的角度,即共振角.以灰度值表示共振角,可以生成对应样品的SPR角谱灰度图,如图7.

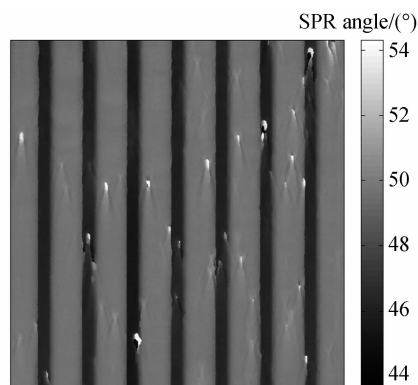


图7 样品的共振角谱灰度图

Fig. 7 Grayscale image of resonance angular spectra of sample

共振角谱灰度图中的每个像素点的灰度都是由通过230帧图像提取出的共振角表示的,是以样品各点共振角差别作为对比.相比于图5的样品SPR图像,此方法消除了反射率波动对成像的影响,大大提高了图像清晰度.样品之外的杂质(如灰尘和样品缺陷)的存在使其所在点的折射率突变,对该点的共振角影响大,这样在样品角谱图中可以容易分辨出样品与杂质.

3 结论

使用大数值孔径显微物镜作为SPR耦合元件,利用632.8 nm He-Ne激光通过物镜会聚来激发金膜产生SPR.并以狭缝光阑限制光束入射角的方式对样品进行SPR成像.通过扫描移动狭缝,实现了对样品在一定范围的SPR角度扫描,从获取的对应不同角度的图像中提取出样品光照区域各点的SPR数据,研究表明,从CCD₂相机对显微物镜后焦面成像,可获得了清晰的SPR吸收圆弧图样.从CCD₁相机对样品进行SPR成像,可获得了样品的清晰像,通过狭缝光阑微移,实现了从 44° 至 54° 的扫描,获取了230帧样品图像,并从这些图像中提取出样品各点的SPR数据,角重构出样品的SPR角谱灰度图,可以直观的看到样品对应的SPR角度变化.

参考文献

- [1] HOMOLA J, YEE S S, GAUGLITZ G. Surface plasmon resonance sensors: review[J]. *Sensors and Actuators B*, 1999, **54**(1-2): 3-15.
- [2] NYLANDER C, LIEDBERG B, LIND T. Gas detection by means of surface plasmons resonance [J]. *Sensors and*

- Actuators B*, 1982, **3**: 79-88.
- [3] LIEBERG B, NYLANDER C, LUNDSTROM I. Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing [J]. *Sensors and Actuators B*, 1983, **4**: 299-304.
- [4] REBECCA L R, DAVID G M, ZHANG Zhong-rang. Recent developments in SPR biosensor technology: application of BIACORE J[J]. *Chemical Sensors*, 2001, **21**(2): 14-23.
REBECCA L R, DAVID G M, 章宗穰. 表面等离子体共振 (SPR)生物传感器技术的进展-BIACORE J的应用[J]. 化学传感器, 2001, **21**(2):14-23.
- [5] ROTHENHAUSLER B, KNOLL W. Surface-plasmon microscopy[J]. *Nature*, 1988, **332**: 615-617.
- [6] BERGUIGA L, ROLAND T, MONIER K, *et al.* Amplitude and phase images of cellular structures with a scanning surface plasmon microscope[J]. *Optics Express*, 2011, **19**(7): 6571-6586.
- [7] CHIU M H, SHIN B Y, LAI C W. Laser-scanning angle deviation microscopy[J]. *Applied Physics Letters*, 2007, **90** (2): 021111-021111-3.
- [8] MOH K J, YUAN X C, BU J, *et al.* Surface plasmon resonance imaging of cellsubstrate contacts with radially polarized beams[J]. *Optics Express*, 2008, **16**(25): 20734-20741.
- [9] SHEN Gang-yi, CHEN Yi, ZHANG Yi-ming, *et al.* Surface plasmon resonance imaging[J]. *Progress in Chemistry*, 2010, **22**(8): 1648-1655.
申刚义, 陈义, 张轶鸣, 等. 表面等离子体共振成像[J]. 化学进展, 2010, **22**(8): 1648-1655.
- [10] LIU Wei, CHEN Yi. Glycoproteins analysis by surface plasmon resonance absorption and imaging [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2008, **29**(9): 1744-1746.
刘巍, 陈义. 表面等离子体共振成像法用于糖蛋白分析[J]. 高等学校化学学报, 2008, **29**(9):1744-1746.
- [11] LI Ying, ZHONG Jin-gang, ZHANG Yong-lin, *et al.* Construction basis of biotic gene chip checking system with surface plasmon resonance imaging [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(12): 2290-2293.
李莹, 钟金钢, 张永林, 等. 表面等离子体共振成像生物芯片检测系统[J]. 光子学报, 2007, **36**(12):2290-2293.
- [12] ZHOU C, JIN W, ZHANG Y, *et al.* An angle-scanning surface plasmon resonance imaging device for detection of mismatched bases in caspase-3 DNA [J]. *Analytical Methods*, 2013, **5**: 2369-2373.
- [13] MOHAMED N, AURELIEN D, BUNTHA E K, *et al.* Angulo-spectral surface plasmon resonance imaging of nanofabricated grating surfaces[J]. *Optics Letters*, 2010, **35** (13): 2209-2211.
- [14] TANAKA T, YAMAMOTO S. Laser-scanning surface plasmon polariton resonance microscopy with multiple detectors[J]. *Applied Optics*, 2003, **42**: 4002-4007.
- [15] GIEBEL K F, BECHINGER C, HEMINGHARS S, *et al.* Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 1999, **76**(1): 509-516.
- [16] KANO H, MIZUGUCHI S, KAWATA S. Excitation of surface-plasmon polaritons by a focused laser beam [J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 1998, **15**(4): 1381-1386.
- [17] LIU S G, CHUANG C J, SEE C W, *et al.* Double-grating-structured light microscopy using plasmonic nanoparticle arrays[J]. *Optics Letters*, 2009, **34**(8): 1255-1257.
- [18] SOMEKH M G, STABLER G, LIU S G, *et al.* Wide-field high-resolution surface-plasmon interference microscopy[J]. *Optics Letters*, 2009, **34**(20): 3110-3112.
- [19] RAETHER H. Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings[M]. Springer, 1986. 8-13.
- [20] GAO Lai-xu, YE Hong-an, LIU Shu-gang, *et al.* Surface plasmon resonance based on microobjective [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2013, **42**(9): 1113-1117.
高来勳, 叶红安, 刘书钢, 等. 基于显微镜的表面等离子体共振[J], 光子学报, 2013, **42**(9): 1113-1111.