

# 基于光热效应的显微光谱技术在单粒子检测中应用和发展

李少华<sup>1</sup>, 赵洪霞<sup>1</sup>, 温晨<sup>1</sup>, 丁志群<sup>1</sup>, 王敬蕊<sup>1</sup>, 程培红<sup>1,2\*</sup>

1. 宁波工程学院电信学院, 浙江 宁波 315211

2. 浙江大学硅材料国家重点实验室, 浙江 杭州 310027

**摘要** 高灵敏度的单粒子检测技术是纳米粒子在生物医学、化学、光电子等领域应用的前提条件。常见的单粒子检测技术主要包括基于粒子的荧光、拉曼、散射和吸收等信号而发展起来的光学显微成像及光谱技术。其中,拉曼光谱和荧光光谱技术主要适用于一些具有拉曼活性的分子/粒子或可发光的荧光分子或粒子,然而即使对于荧光效率高的有机染料分子和半导体纳米粒子,固有的光漂白和 blinking 现象也对单粒子探测形成了挑战。散射光谱测量是应用于单粒子检测的另外一种方法,从理论上讲,由于瑞利散射随着尺寸的减小而呈六次方减弱的趋势,在细胞或生物组织内,小尺寸粒子的散射信号很难从背景散射噪声中分离出来。众所周知,介质吸收激发光后会引介质内的折射率变化,进而在光加热区附近出现折射率的梯度分布,称为光热效应(photothermal effect)。基于粒子光热效应的光学显微成像和光谱测量技术具有信号灵敏度高、无背景散射、原位和免标记等优点,在单粒子检测领域展现了良好的应用潜力。综述了近年来基于光热效应的显微光谱技术在单粒子检测中应用和研究发展,首先介绍了光热效应的测量原理;接着分别讨论了光热透镜测量技术、微分干涉相差测量技术和光热外差测量技术的实验装置,比较了各种测量技术的信噪比、灵敏度、分辨率等特点,并且介绍这些测量技术在单粒子检测中的应用研究进展;接着,论述了近年来研究人员在提高光热显微测量的信噪比、改善动态测量性能以及在红外波段拓展等方面的最新研究成果;最后,简单总结了光热测量技术在单粒子检测领域所面临的挑战。

**关键词** 单粒子检测;光热显微镜;光热效应

**中图分类号:** O657.3

**文献标识码:** R

**DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)02-0379-09

## 引言

由于具有小尺寸效应、表面效应以及量子效应,纳米粒子在光、电、热等方面均表现出优异的特性,被广泛应用于生物、电子、光学、医学等领域<sup>[1-4]</sup>。受其尺寸限制,单粒子的简单灵敏的检测方法对其应用来讲是至关重要的。目前,单粒子的光学检测方法普遍采用 SERS 和激光诱导荧光信号等测量方法<sup>[5-9]</sup>。但是,这类检测主要局限在具有 SERS 活性的粒子或可发光的荧光分子或粒子。并且,即使对于发光性能较好的有机染料分子和半导体纳米粒子,固有的光漂白和 blinking 现象也对单粒子探测形成了挑战。光散射测量是应用于超细粒子的显微成像和检测的另外一种方法,但从理论上讲,受液体背景下瑞利散射截面所限,最小的探测尺寸大约为 80 nm。文献已有报道,在表面等离子共振频率的暗场

照明下结合微分干涉对比技术和视频增强技术可探测到直径小于 40 nm 金属粒子<sup>[10]</sup>。然而,由于瑞利散射随着尺寸的减小而呈六次方减弱的趋势,在细胞或散射组织内,小尺寸粒子的散射信号很难从背景散射噪声中分离出来。

众所周知,介质吸收电磁波后,部分或者全部激发能会转化为热能。20 世纪 70—80 年代,研究人员基于这种能量的弛豫机制发展了基于光热效应的光谱技术<sup>[11-16]</sup>。其中比较常见的包括光热干涉技术、热透镜、光热偏转等测量技术,并且这些测量技术也逐渐与光学显微成像结合起来。利用这些测量方法,研究人员测量了薄膜、固体、液体和气体等样品中物质的微弱光吸收,检测极限可达到 ng 甚至 pg 量级。随着技术的不断发展,近年来光热测量技术在单粒子、单分子检测领域体现了极强的应用前景。本论文主要介绍基于光热效应的光谱检测技术在单粒子/分子成像和光谱检测方面的应用和发展历程。主要包括热透镜显微技术、偏振干涉测

收稿日期: 2019-12-26, 修订日期: 2020-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(61605097), 浙江省公益技术研究计划项目(LGC20F050001)资助

作者简介: 李少华, 1998 年生, 宁波工程学院电信学院硕士研究生 e-mail: 3067528894@qq.com

\* 通讯作者 e-mail: peihongcheng@163.com

量技术、光热差分测量等技术的实验装置、原理以及在单粒子/分子检测方面的应用, 论文还论述了近年来研究人员在提高光热显微技术的信噪比、实现动态测量以及拓展红外测量方面的研究进展。

## 1 光热测量原理

介质对激发光的吸收会引起介质内的折射率变化, 并且会在加热区附近出现折射率的梯度分布, 称为光热效应。人们利用第二束探测光入射至介质, 可以获取光热效应导致的光程改变、折射率曲率变化或光偏转等, 由这些信号就可以得到介质内的光吸收特性。对于纳米粒子而言, 它的吸收截面随着尺寸的减小而呈三次方减小的趋势, 当粒子小至某一尺寸后, 吸收将会大于散射。强吸收所导致光热效应会导致颗粒周围的温度增加。

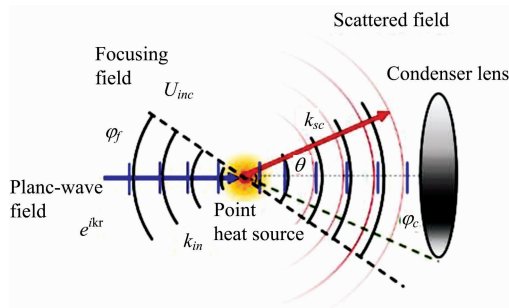


图 1 单粒子光热测量原理模型<sup>[17]</sup>

Fig. 1 Schematics of measurement principle of single-particle photothermal effect

根据热传导理论, 假设粒子位于各向同性介质中, 如图 1 所示, 当激发加热光束作用在粒子上, 在距离功率为  $P[1 + \cos(P[1 + \cos(\omega t)])]$  加热点(即纳米粒子)的某处温度  $T$  可以表示为

$$T - T_0 = \frac{P}{4\pi kr} \left[ 1 + \exp\left(-\frac{r}{R}\right) \cos\left(\omega t - \frac{r}{R}\right) \right]$$

其中,  $T_0$  是环境温度,  $k$  是介质热导率,  $\omega$  是激发光的调制频率,  $R$  是在频率  $\omega$  下的热扩散特征长度。由于  $\Delta n = \frac{\partial n}{\partial T} \Delta T$ ,  $\frac{\partial n}{\partial T}$  是介质折射率随温度的变化率(热光系数), 这一温度场分布引起介质内折射率分布的变化。根据散射模型, 当入射平面波探测光束通过显微物镜聚焦在粒子上, 粒子周围的折射率分布将会引起光的偏转形成散射场<sup>[17-18]</sup>, 透射/反射和散射光共同被收集进入探测器, 人们可以通过光束调制、干涉、外差等技术将粒子的光热信号提取出来, 从而获得粒子的光吸收特性。有关粒子光热测量的理论模型不断完善和发展, 例如, Takayoshi Kobayashi 小组在散射模型的基础上将透镜对平面波的聚焦作用考虑进去, 分析了角度和调制频率对光热信号影响<sup>[17]</sup>。与散射模型中采用的平面光波入射不同, Frank Chichos 小组从几何光学角度, 利用 ABCD 高斯矩阵光学建立了高斯型光束入射下光热显微测量的理论模型<sup>[19]</sup>。

## 2 常见的光热显微测量技术

### 2.1 热透镜测量技术

最初, 光热测量技术一般被用于平面样品的检测, 1990 年, 东京大学的 Tsuguo Sawada 小组将光热偏转测量技术用于单个微球的检测中, 所采用的树脂微球的尺寸在  $200 \sim 600 \mu\text{m}$  之间<sup>[20-21]</sup>。1993 年, 该组将显微镜引入光热偏转测量系统, 实验装置如图 2 所示, 在这一测量系统中, 激发加热光使用  $\text{Ar}^+$  激光器的 488 nm 波长, 探测光束为功率 1 mW 的 He-Ne 激光器的 633 nm 波长, 激发光经声光调制后和探测光束同轴引入显微物镜, 经显微物镜后聚焦在样品上, 光束经样品后由滤光片去除激发光。如图 3(a) 所示, 由于吸收介质的折射率一般具有负温度系数, 因此, 激发光束的吸收导致的热透镜效应会使探测光束发散, 通过测量透过小孔的探测光束的强度变化可检测样品的热信号。该光热显微测量系统对染料包覆的树脂微球样品的检测极限达到了 fg 量级, 并且, 信号的空间分辨率近  $10 \mu\text{m}$ <sup>[22]</sup>。在这一测量系统中, 激光发和探测光同轴引入显微镜, 利用物镜的色差使两束光束聚焦于不同的点, 可以避免调整和准直激发和探测光束的麻烦。考虑到测量原理基于热透镜效应, 因此, 研究人员将这种探测方法归类于双光束热透镜测量技术<sup>[23-25]</sup>。

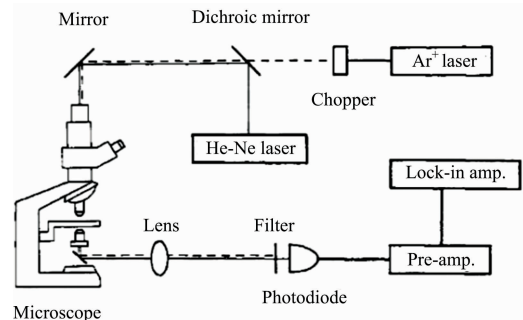


图 2 热透镜显微测量装置示意图<sup>[22]</sup>

Fig. 2 Schematics of the experiment set-up

1995 年, Sawada 小组将这种热透镜显微技术应用于水环境中染色生物细胞的分析中, 显示了这种探测技术在生物领域的应用前景; 1998 年, Sawada 小组利用该技术成功地检测了液体中单个粒子的脉冲光热信号, 并分别对它们进行计数<sup>[26]</sup>。图 3(b) 是显微镜焦点附近液体环境中单粒子光热显微检测的截面示意图, 根据 Sawada 的模型<sup>[20]</sup>, 透过物镜的激发光诱导样品中的热效应, 对单个粒子, 其尺寸远小于光束的束腰半径, 在激光束探测体积内, 作布朗运动的单个粒子像一个运动的点状热源, 粒子周围的温度梯度增强了光热效应。图 4 为不同粒子数浓度的 80 nm 聚苯乙烯球的光热信号响应, 其中探测区粒子数在 0 到  $8.7 \times 10^{-4}$  之间变化。从图中可以明显观察到痕量粒子的光热脉冲信号。同时研究人员发现, 系统的光热信号响应主要决定于锁相放大器的时间常数, 在传统的热透镜测量中, 常采用增大时间常数的方法改善信噪比。而在单粒子检测中, 粒子在探测区体积内平均停留时间仅有几十到几百毫秒量级, 具体时间与粒子的尺

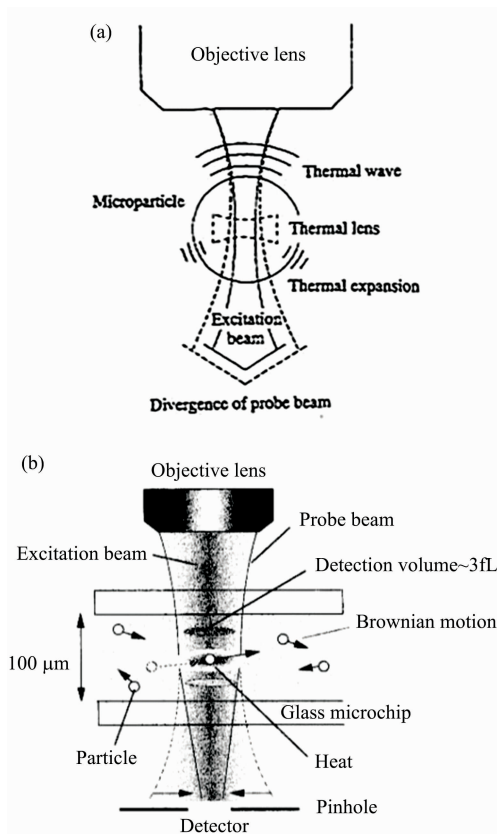


图 3 (a)热透镜效应示意图<sup>[22]</sup>; (b)单粒子在液体微区内的光热效应示意图<sup>[26]</sup>

Fig. 3 (a) Schematic of photothermal phenomena; (b) Schematic illustration of the photothermal measurement of a nanoparticle in liquid microspace

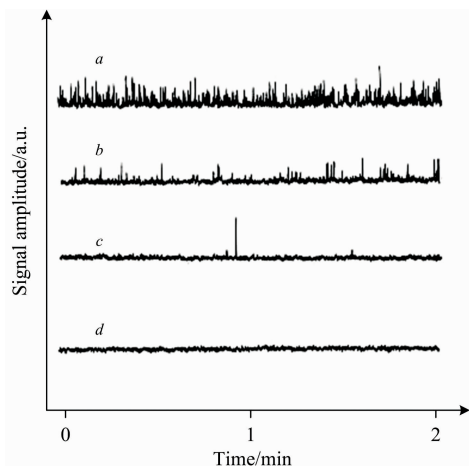


图 4 痕量 80 nm 聚苯乙烯微球溶液的光热信号, 期望值(探测区内的粒子数)分别为 (a)  $8.7 \times 10^{-4}$ , (b)  $1.8 \times 10^{-4}$ , and (c)  $3.6 \times 10^{-5}$ , (d) 超纯水(空白样)

Fig. 4 Monitored signals for the trace turbid solution of 80 nm polystyrene particles. The expectation values were (a)  $8.7 \times 10^{-4}$ , (b)  $1.8 \times 10^{-4}$ , and (c)  $3.6 \times 10^{-5}$ , (d) Ultrapure water (blank)

寸有关。因此, 锁相放大器较小的时间常数更有利于提高脉冲信号的信噪比。

在光热透镜测量系统中, 显微物镜的色差会使激发光束和探测光束聚焦于不同的点, 二者聚焦的位置对探测信噪比有极大影响。当两束光聚焦点相距  $3^{1/2}Z_c$  时 ( $Z_c$  共焦距离) 系统的灵敏度最佳。因此, Takehiko Kitamori 等改进了实验装置<sup>[27-29]</sup>, 引入了焦点控制单元来调整激发和探测光的聚焦点的相对位移, 以达到最佳的热透镜测量布局。此外, 光热透镜显微测量的空间分辨率是由热扩散长度决定的, 因此, 材料本身的热光系数和激光的调制频率也是决定测量分辨率的两个重要参数。在测量系统中一般将探测光调制在 1 kHz 左右, 采用锁相放大器来去除背景信号提高信噪比, 但是这样并不能去除由背景噪声导致的 1 kHz 左右的低频波动的影响。

### 2.2 微分干涉相差测量技术

在热透镜测量技术中, 主要通过检测热致折射率变化所引起的透射光强度的变化。当采用这种技术来检测纳米流体 (nanofluidics) 时, 由于纳米通道 (nanochannel) 的尺寸小于波长, 因此不能用几何光学来描述热透镜的折射现象, 而探测光热效应引起的相位信号变化可以解决这一问题。2002 年, 法国波尔多大学国家科学研究中心的 Brahim Lounis 小组和荷兰莱顿大学惠更斯实验室的 Michel Orrit 小组采用灵敏的微分干涉方法来探测粒子光热效应引起的微弱相位变化<sup>[30-31]</sup>。图 5(a) 是测量的实验装置, 采用了 514 nm 的  $Ar^+$  激光器作为激发加热光源, He-Ne 激光器 633 nm 激光作为探测光束。将加热光束的功率保持在 20 mW, 并用声光调制器将频率调制在某一频率 (100 kHz 和 10 MHz 之间)。探测光束通过偏振分束后经过一个 Wollaston 棱镜后偏振方向旋转 45 度, 之后分成两个垂直偏振的光束, 夹角约  $0.1^\circ$ 。两束

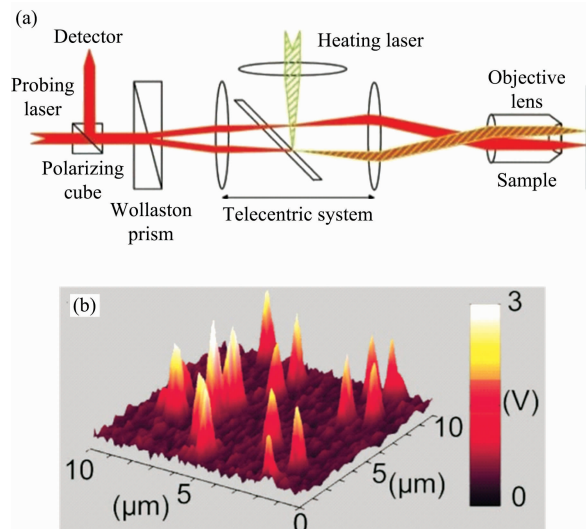


图 5 (a)偏振干涉光热测量装置; (b)直径为 5 nm 的金纳米粒子的光热成像<sup>[30]</sup>

Fig. 5 (a) Schematics of the experiment set-up; (b) photo-thermal images of 5 nm gold nanoparticles in a few tens of nanometers thick polyvinyl alcohol film on a glass substrate

光聚焦到显微镜物镜的物平面形成两个相距  $1.2 \mu\text{m}$  的光点。加热光束经分束器后与其中一束探测光重合。两束探测光经样品表面反射后在 Wollaston 棱镜中重合，二者的相位差引起的垂直偏振光信号被偏振立方体反射进入快速探测器。显然，两个探测光束的相位差变化与某点的平均温度呈正比关系。

在微干涉相差测量中，为了使两束反射光在 Wollaston 棱镜达到最佳重合，研究人员在光路内插入远心镜头系统使得棱镜处于物镜的像焦平面，并通过调整加热光束在两个探测光点间移动，当它与某一个探测光点重合时能够获得最大的信号。为了提高测量的信噪比，实验采用了锁相放大器来检测调制频率下两束探测光的强度变化以及相位变化，并且采用了高频调制的方法来抑制噪声，调制频率决定温度调制的区域，通过频率的选择使得温度调制区域的体积容量与显微物镜聚焦点大致重合。为了获得单个粒子的显微成像，样品由精密位移台控制并相对于三个光点进行扫描。在这一实验中，研究人员获得了直径为  $5 \text{nm}$  的金纳米粒子的显微图像，如图 5(b) 所示，该测量的信噪比达到了 10。

液体环境中单粒子探测的难度较大，这主要是由于粒子的快速布朗运动会导致在聚焦区内停留时间非常短暂（约几个毫秒），在这种情况下是无法利用信号积分的方法来改善探测极限的。2009 年，Takehiko Kitamori 小组利用微干涉相差法对水中的单个金纳米粒子 ( $5 \text{nm}$ ) 进行计数<sup>[32]</sup>，并研究了微干涉相差测量中激发光的偏振方向和调制频率对光热信号的影响。为了获得良好的相位对比，他们采用一对差分干涉相差棱镜，它们具有  $5 \mu\text{m}$  的高切变值，与热扩散长度一致。实验表明，与传统的热透镜测量技术相比，微干涉相差测量方法可使信号的背景降至  $1/100$ ，信噪比提高 1 个数量级。

在活细胞生物标记成像方面，单粒子(分子)跟踪是常用

的方法，但是所采用的标记粒子必须尺寸足够大 ( $>40 \text{nm}$ )，其瑞利散射强度才能通过传统的光学显微镜检测。另一方面，单分子检测中常采用的有机染料、蛋白质标记分子的光漂白问题限制了它在活细胞内的观察时间。利用光热法可以实时检测小尺寸金属纳米粒子，从而解决以上问题。2003 年，Cognet 等采用  $10 \text{nm}$  的金粒子作为标记，利用干涉光热测量技术成功对膜蛋白显色成像<sup>[42]</sup>，实验发现，该方法面临的一个限制是信噪比与光吸收导致的样品温度上升之间的平衡。

### 2.3 光热外差测量技术

尽管干涉相差法具有较高的灵敏度，但是它受限于干涉仪两臂光束的重合度以及二者相位差的波动。2004 年，Brahim Lounis 小组提出了光外差法用于检测单个纳米粒子的光热信号，并实现了对仅包含 67 个原子的金属纳米团簇成像。与微干涉相差法相比，信号的灵敏提高了 2 个数量级<sup>[33]</sup>。

理论上，对于一个处于各向同性介质中的金纳米颗粒或其他吸收纳米粒子，在一束强度调制的激光照射下，可以看作一个热功率为  $P_{\text{heat}}[1 + \cos(\Omega t)]$  的热源，其中  $\Omega$  是调制频率， $P_{\text{heat}}$  是粒子吸收的平均激光功率。光热效应导致粒子周围介质受时间调制的折射率分布发生变化<sup>[32]</sup>

$$\Delta n(r, t) = \frac{\partial n}{\partial T} \frac{P_{\text{heat}}}{4\pi\kappa r} \left[ 1 + \cos\left(\Omega t - \frac{r}{R_{\text{th}}}\right) e^{-r/R_{\text{th}}} \right]$$

其中， $r$  是与粒子的间距， $n$  为介质的折射率， $\frac{\partial n}{\partial T}$  是折射率随温度的变化率， $R_{\text{th}} = \sqrt{2\kappa/\Omega C}$  为热扩散特征长度， $\kappa$  和  $C$  是介质热导率和单位热容。当探测光束与这一折射率分布场相互作用后，散射光将包含频移  $\Omega$  的边带信号，利用锁相放大器检测散射光与参考光干涉后调制频率为  $\Omega$  的拍频信号即可获取样品的光致热分布。

其测量装置如图 6(a) 所示<sup>[34]</sup>，采用了 Ti 蓝宝石激光器

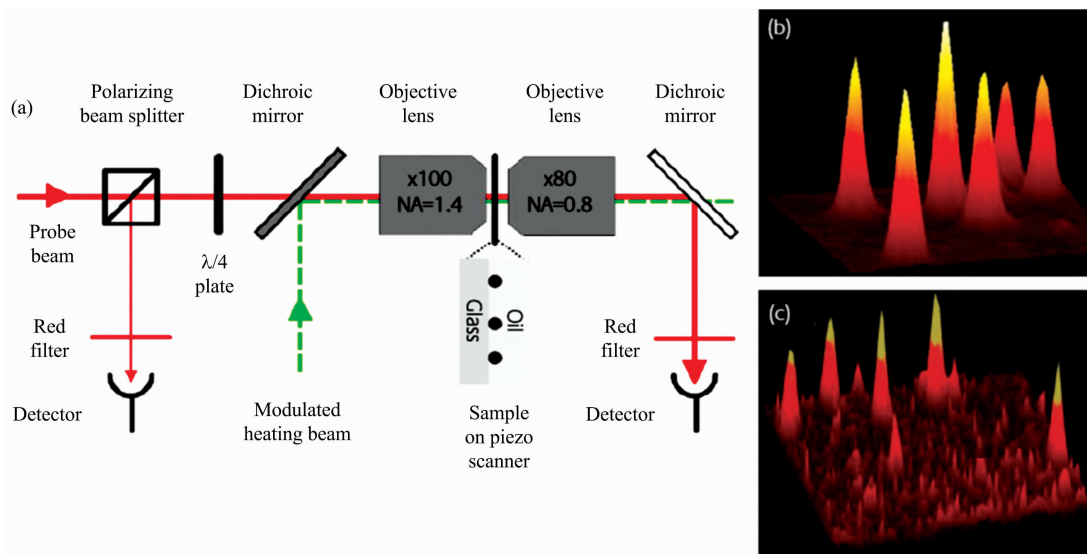


图 6 (a) 光热差分显微测量装置；(b) 直径为  $5 \text{nm}$  的金纳米粒子的光热成像；(c)  $1.4 \text{nm}$  的金纳米团簇光热图像<sup>[33]</sup>

Fig. 6 (a) Experiment Schematics of photothermal heterodyne imaging method; (b) photothermal imaging of isolated  $5 \text{nm}$  Au nanoparticles; (c) photothermal image of isolated  $1.4 \text{nm}$  Au nanoparticle



的 720 nm 作为探测光, Nd: YAG 的倍频光 532 nm 作为加热光束。为了避免吸收光功率对电子弛豫动态的影响, 实验采用弱激发条件, 使得两次连续吸收过程的平均时间间隔比纳米粒子的弛豫时间长。利用声光调制器将加热光束调制频率保持在 100 kHz 到 15 MHz。两束光用高孔径物镜聚焦在样品同一点, 探测光与散射场干涉作用后通过另一物镜、分色镜和红光滤光片后进入锁相放大器。实验中激光光点固定, 通过 2D 压电扫描系统移动样品从而获取粒子的显微图像。图 6(b) 和 (c) 分别是直径为 5 nm 的金纳米粒子和 1.4 nm 金纳米团簇的三维光热外差图像。可以看出, 图像中没有衬底的背景噪音, 信号完全来自于光吸收粒子即金纳米团簇。此外, 该小组利用这一方法在弱光照射下成功地完成了对 CdSe/ZnS 发光量子点的成像, 并且还测量了单个金纳米粒子的吸收截面。

与早期的光热透镜测量和干涉相差测量技术相比, 光热外差显微技术具有灵敏度高、装置相对简单, 无需光束准直等显著优点, 因而在单粒子检测方面获得了广泛的应用<sup>[34-45]</sup>。2005 年, BrahimLounis 小组利用光热外差法测量了单个金纳米粒子的吸收光谱, 研究了金属纳米粒子表面等离子吸收的尺寸效应, 清楚地观察到了最小直径为 5nm 的金纳米粒子的局域表面等离子共振的均匀展宽<sup>[35]</sup>。同年, 该小组利用同样的方法首次在室温下测量了单个 CdSe/ZnS 半导体纳米晶的吸收光谱, 观察到了带边 X 态和高能态 ( $1S_e$ ,  $2S_{h,3/2}$ ) 的共振吸收, 测得了吸收和荧光谱线的斯托克位移<sup>[37]</sup>。2008 年该组又将光热外差法用于单根碳纳米管吸收截面的测量<sup>[38-39]</sup>。2010 年, Greg Hartland 小组用光热外差成像法测量了单根 CdSe 纳米线的吸收截面, 并且观察到了纳米线沿不同方向的各向异性光吸收现象<sup>[40]</sup>。同年, Orrit 小组利用该技术首次在室温下测量了单个 BHQ1 (Black-Hole-Quencher) 分子的吸收截面<sup>[41]</sup>, 实验结果表明, 这一测量技术对缺陷或粗糙度的散射不敏感, 在 300 ms 的积分时间内单分子检测的信噪比可达到 10。2015 年, 莱斯大学的 Stephan Link 小组将多波长超连续激光作为加热光束引入光热测量装置, 测量了金属纳米粒子的吸收光谱, 并且实验确定了不同尺寸和形状的单粒子的吸收和散射光谱间的相对

位移<sup>[42]</sup>。

光热外差法在生物机理研究中也展示了优异的应用前景<sup>[35, 43-48]</sup>。2006 年, Lasne 等利用更高灵敏度的光热外差法检测了利用低粒子数密度的 5 nm 金粒子标记的膜受体在活的 COS7 细胞内的二维运动轨迹, 并且实验发现, 对于水介质中 5 nm 的金纳米粒子, 功率密度为  $400 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$  的激光仅会引起 1.5 K 的升温<sup>[44]</sup>。2011 年, Leduc 等利用光热外差法探测了 MUS/OT 包覆的金纳米粒子在细胞质内的动态特性, 并且可根据光热信号获知探测区内局部的细胞粘度信息<sup>[46]</sup>。

### 3 单粒子光热检测技术的发展

#### 3.1 信噪比的改进

在光热测量技术中, 纳米粒子或分子样品均浸没在光热介质中, 如空气、水、硅油、甘油等, 因此周围介质的光热特性是决定信号强度的一个重要因素。定义光热介质的品质因数  $FOM = n \left| \frac{\partial n}{\partial T} \right| \frac{1}{\kappa}$ , 其中,  $\partial n / \partial T$  称为介质的折射率敏感系数, 也称光热系数。采用热光系数高的材料作为纳米粒子的周围介质可以大大改善光热信号的信噪比<sup>[49-52]</sup>。Michael Orrit 等将纳米粒子置于甘油内, 与在水中相比光热外差成像的信噪比提高了 5 倍; 当将纳米粒子置于正戊烷溶液内时, 成像信噪比与甘油中相比又提高了 5 倍<sup>[49]</sup>。2012 年, Brahim Lounis 小组又选用了 4-cyano-4'-penylbiphenyl(5CB) 液晶作为周围介质, 利用液晶相变时强烈的折射率变化特性, 将金纳米粒子成像信噪比比水环境中提高了近 40 倍。图 7 对比了尺寸为 28 nm 的金纳米粒子在不同介质内光热成像, 介质为水和硅油时光热信号如图 7(b) 和 (c) 所示, 介质为 23 和 31 °C 的 5CB 液晶时的实验结果如图 7(d) 和 (e) 所示。显然, 介质对图像信噪比影响极大, 当粒子置于液晶且相变温度 31 °C 时, 图像的信噪比最好<sup>[51]</sup>。2016 年, Oriit 小组又将超临界流体 Xe 作为粒子的浸没介质, 在液-气相变的临界点流体 Xe 介质具有极大的光热系数, 利用这一特性将 5 nm 粒子的光热差分显微成像的信噪比提高了 440 倍<sup>[52]</sup>。

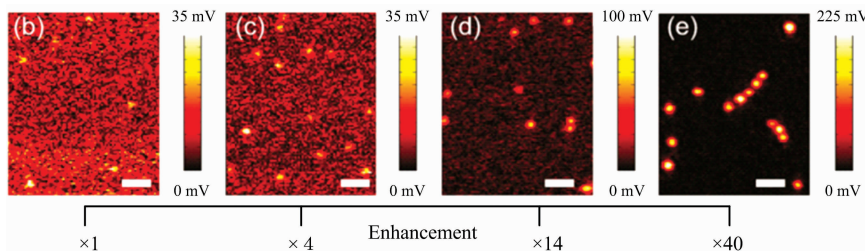


图 7 直径为 28 nm 的金纳米粒子在不同介质条件下的光热信号对比

(b): 水; (c): 硅油; (d): 23 °C 时液晶 5CB; (e): 31 °C 时液晶 5CB<sup>[51]</sup>

Fig. 7 Photothermal images of 28 nm gold nanoparticles recorded in different media

(b): Water; (c): Silicone oil; (d): 5CB at 23 °C; (e): 5CB at 31 °C

#### 3.2 动态测量技术的发展

##### 3.2.1 光热关联光谱法 (photothermal correlation spectroscopy)

2009 年, 光热信号关联光谱技术开始被用于探测单个纳米粒子在介质中的扩散、光物理等动态特性研究中<sup>[53-56]</sup>, 与荧光关联光谱 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) 类

似, 它测量与纳米粒子光吸收成正比的光热信号的相关函数。其检测实验装置与光热外差法一样, 时间调制的激发光束诱导纳米粒子周围的随时间改变的折射率分布, 探测光束与折射率分布相互作用后携带与调制频率同步的散射信号, 探测器检测该散射场与前向透过光束相干后的拍频信号。在自相关测量中, 探测光束、激发光束以及样品位置保持不变, 伴随纳米粒子在探测区域内扩散的高取样频率下信号的涨落被记录下来。该信号主要来自于光热信号( $s$ )的自相关函数 $[G(\tau)]$ 为

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta S(t) \delta S(t+\tau) \rangle}{\langle S(t) \rangle^2} = \frac{\langle S(t) S(t+\tau) \rangle}{\langle S(t) \rangle^2} + 1$$

其中 $\langle \rangle$ 代表时间平均。假设观察区域是椭圆高斯形分布, 并且粒子运动为自由扩散, 那么,

$$G(\tau) = \frac{1}{N \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \left(1 + \frac{\tau}{A^2 \tau_D}\right)^{1/2}}$$

其中 $N$ 是观察区域的平均粒子数,  $A$ 是观察区域的形状参数,  $\tau_D$ 是特征扩散时间。观察区域的形状参数 $A$ 对确定特征扩散时间是非常重要的, 假设探测区域为准共焦(quasi-confocal)高斯形状,  $A = W_z / W_{xy}$ ,  $W_z$ 和 $W_{xy}$ 分别为椭球横向和纵向半径。在实验中, 根据归一化自相关函数拟合实验曲

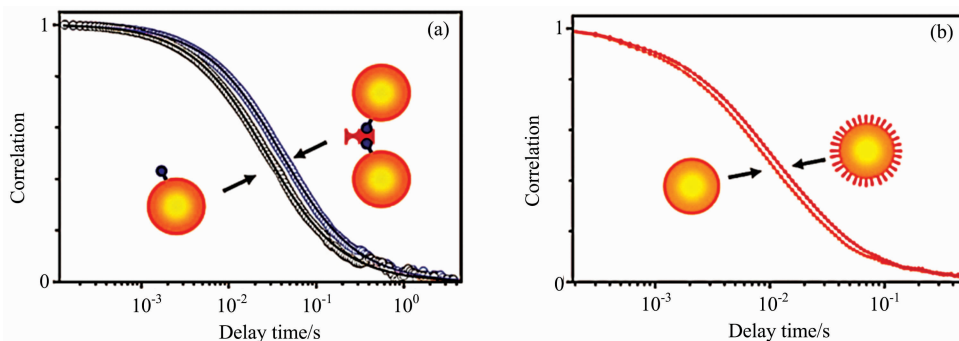


图 8 (a) 10 nm 生物素单功能化的纳米粒子(左)和与链酶亲和素混合后(右)的纳米粒子的光热信号关联曲线; (b) CALNN 包覆前后的纳米粒子光热信号关联曲线

Fig. 8 (a) Photothermal correlation curves obtained from 10 nm biotin monofunctionalized nanoparticles(left) and upon mixture with streptavidin. Solid lines represent theoretical fits using eq 2; (b) Photothermal curves from bare and CALNN-coated gold nanoparticles. CALNN is a 5 amino-acid long peptide

### 3.2.2 光热外差全息成像(photothermal heterodyne holography)

常规的光热测量技术一般采用单点测量, 它通过激光对粒子周围折射率的变化进行空间扫描成像, 因此, 入射光瞬时的噪声将会引起图像在空间上的噪声。同时, 单点测量很难提供快速的大视场成像, 难以获得粒子间的相对位移等信息<sup>[60-61]</sup>。光热激发与数字外差全息技术的结合是近年发展的大视场(100  $\mu\text{m}^2$  区域)光热探测方法<sup>[61]</sup>。其测量装置如图 9 所示, 光热激发采用波长为 532 nm 的正弦调制的连续波激光, 通过分束器后直接进入物镜照射在样品上。全息照相臂采用波长为 785 nm 单模激光二极管, 由半波片和偏振分束器将光分为参考光束和照射光束。二者都采用了声光调制器将频率调制在 80 MHz 附近。为了使两束光的偏振方向一致以便干涉, 在其中一束光路上加入半波片。与大多数差分干

涉仪一样, 该装置可以通过选择适当的失谐频率来研究调制在任一频率下的光热信号。

线, 获得参数 $N$ 和 $\tau_D$ , 由扩散时间 $\tau_D$ 和液体的粘度系数 $\eta$ 以及与温度和装置几何形状相关的参数 $\gamma$ 间的关系,  $\tau_D = \gamma \eta d$ , 就可以获得粒子在液体介质中的动态半径以及扩散情况。如图 8 所示, Vivien 等用这种技术测量了功能化修饰的金纳米粒子的光热关联曲线, 通过与理论拟合, 可以分别获取生物素单功能化、链酶亲和素混合后的纳米粒子以及 CALNN 包覆前后的纳米粒子光热信号的关联曲线, 得到不同修饰的纳米粒子的扩散时间, 进而获取粒子动态的流体学直径, 精度可达到纳米量级<sup>[53]</sup>。

2013 年, Markus Selmke 等在双焦点探测区域体积近似的基础上分析评价相关函数, 提出了一个新的光热关联光谱测量技术<sup>[57-58]</sup>。结果表明, 该技术可以测量 14 nm 的金纳米粒子在辐射压力引导下的漂移速度大约为 10 nm  $\cdot$  ms<sup>-1</sup>, 这一数值低于单粒子荧光关联光谱测量的探测极限, 在这一测量中, 由于样品的采样体积非常小, 大约飞升(femtoliter)量级, 因而获取的光热信号不包含空间和时间分布的信息。2015 年, 利物浦大学的 Nievers 等将栅格图像关联光谱技术应用于光热显微镜成像系统, 不仅实现了纳米粒子空间分布的观察, 而且获得了粒子在宽时间范围内的扩散动态<sup>[59]</sup>。

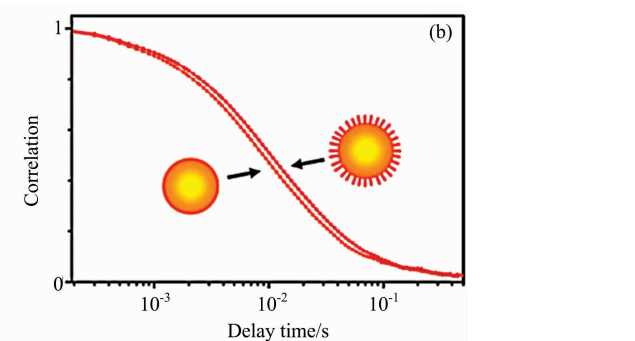


图 9 光热外差全息成像的测量装置示意图  
Fig. 9 Experimental setup of photothermal heterodyne holography

这种光热外差全息成像方法可以在 5 s 内对  $180 \mu\text{m}^2$  范围内的样品成像,与单点扫描成像技术的  $25 \mu\text{m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  相比要高的多。同时,该方法可以研究纳米粒子在三维空间的信息,在生物领域对标记纳米粒子的三维成像中具有较高的应用价值。然而值得注意的是,与单点检测相比,大视场检测的信噪比要大约低一个数量级。该方法需要在大的观测范围、视频速率采样速率以及大热扩散半径之间权衡协调。此外,要获得在大视场内对样品加热的功率密度,就需要超高的激光功率,这就有可能会对样品造成损伤。

### 3.3 激发光波长的拓展

红外显微技术与光谱技术的结合可用于微区样本分析,在材料、生物等领域具有非常广阔的应用前景。然而,由于红外光谱中大多数可利用的激光波长位于中红外( $3 \sim 11 \mu\text{m}$ ),瑞利判据  $\Delta = 0.61\lambda/\text{NA}$  的限制决定了红外显微镜的空间分辨率普遍较低,采用固体浸没透镜可提高分辨能力,但最多可以使分辨率达到  $2 \mu\text{m}$  左右。近年来,红外光热外差显微技术逐渐发展起来<sup>[62-69]</sup>。与普通光热外差测量装置不同的是采用中红外激光作为激发光源,仍然采用可见光为探测光,这样光热差分显微技术不仅可以测量样品带间吸收的光热信号,还可测量带内跃迁、振动跃迁吸收等。并且,信号的空间分辨率可提高至亚微米量级。2017 年, Gregory V.

Harland 小组利用中红外可调谐光学参数振荡器( $2.5 \sim 3.7 \mu\text{m}$ )作为激发光源,532 nm 激光作为探测光,在干燥环境中实现了亚微米尺寸聚合物粒子的成像,分辨率达到  $0.3 \mu\text{m}$ <sup>[67]</sup>。同年, Bijeesh 等采用双光子吸收导致的热效应,对单个 20 nm 的  $\text{BaTiO}_3$  纳米粒子的成像,由于非线性光激发可避开生物组织对 350~650 nm 可见光的吸收,从而实现快速深组织成像,因此,红外光热成像在生物非线性光学标记领域展现出了良好的应用前景<sup>[62]</sup>。

## 4 结 论

基于光热效应的显微光谱技术具有优异的时空分辨率、信噪比和灵敏度,可实现对样品的实时、原位和免标记检测,因而,近年来在单粒子成像和光谱分析方面取得广泛的应用。但是,光热显微技术的发展仍然面临一些挑战,比如实验装置相对复杂、信号的时间分辨率较低、检测速度慢等问题。通过技术的不断进步,可望克服现有技术的不足,进一步提升其检测性能<sup>[70-72]</sup>。同时,在大数据时代,基于机器视觉等人工技术的图像分析和数据处理技术可以高效的从海量的图像数据中获得更准确的信息,这些技术的引入可望进一步推动光热显微光谱技术在单粒子检测领域的应用。

## References

- [1] Hsu S W, Rodarte A L, Som M, et al. *Chemical Reviews*, 2018, 118: 3100.
- [2] Ding Liang, Alan M Bond, Zhai Jianping, et al. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 797: 1.
- [3] FENG Shi-liang, WANG Jing-yu, CHEN Shu, et al(冯仕靓,王靖宇,陈舒,等). *Acta Physica Sinica(物理学报)*, 2019, 68(14): 147801.
- [4] Wei Hong, Pan Deng, Zhang Shunping, et al. *Chemical Reviews*, 2018, 118: 2882.
- [5] YUAN Ting-lian, JIANG Ying-yan, WANG Wei(袁婷联,蒋莹琰,王伟). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2016, 28(5): 607.
- [6] Marc Vendrell, Kaustabh Kumar Maiti, Kevin Dhaliwal, et al. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31: 249.
- [7] Zhang Kenneth Yin, Yu Qi, Wei Huanjie, et al. *Chemical Reviews*, 2018, 118: 1770.
- [8] Jaime Ortega Arroyo, Philipp Kukura. *Nature Photonics*, 2016, 10: 11.
- [9] WANG Yong-jie, WANG Wei(王咏婕,王伟). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2017, 75(11): 1061.
- [10] Jaime Ortega-Arroyo, Philipp KuKura. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, 14: 15625.
- [11] Konan Peck, Michael D Morris. *Anal. Chem.*, 1986, 58: 2876.
- [12] Jackson W B, Amer N M, Boccara A C, et al. *Applied Optics*, 1981, 20: 1333.
- [13] Andreas Mandelis. *J. Appl. Phys.*, 1983, 54: 3404.
- [14] Whinnery J R. *Accounts of Chem. Res.*, 1974, 7: 225.
- [15] Castillo J, Fernandez A, Mujica V. *Mikrochim. Acta*, 1998, 130: 105.
- [16] Swofford R L, Morrell J A. *J. Appl. Phys.*, 1978, 49: 3667.
- [17] Jun Miyazaki, Hiromichi Tsurui, Koshi Kawasumi, et al. *Optics Express*, 2014, 22: 18833.
- [18] Stéphane Berciaud, David Lasne, Gerhard A Blab, et al. *Physical Review B*, 2006, 73: 045424.
- [19] Markus Selmke, Marco Braun, Frank Cichos. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2012, 29: 2237.
- [20] Wu Jiaqi, Takehiko Kitamori, Tsuguo Sawada. *Appl. Phys. Lett.*, 1990, 57: 22.
- [21] Wu Jiaqi, Takehiko Kitamori, Tsuguo Sawada. *J. Appl. Phys.*, 1991, 69: 7015.
- [22] Masaaki Harada, Kouji Iwamoto, Takehiko Kitamori, et al. *Anal. Chem.*, 1993, 65: 2938.
- [23] Masaaki Harada, Masashi Shibata, Takehiko Kitamori, et al. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 299: 343.
- [24] Fang H L, Swofford R L. *Ultrasensitive Laser Spectroscopy*. Academic Press, New York, 1983. 175.
- [25] Manabu Tokeshi, Marika Uchida, Kenji Uchiyama, et al. *Journal of Luminescence*, 1999, 83-84: 261.
- [26] Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori, Tsuguo Sawada, et al. *Anal. Chem.* 1998, 70: 5037.
- [27] Manabu Tokeshi, Marika Uchida, Akihide Hibara, et al. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 2112.

- [28] Hiroko Kimura, Fumiko Nagao, Asako Kitamura, et al. *Analytical Biochemistry*, 2000, 283: 27.
- [29] Uchiyama K, Hibara A, Kimura H, et al. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2000, 39: 5316.
- [30] David Boyer, Philippe Tamarat, Abdelhamid Maali, et al. *Science*, 2002, 297: 1160.
- [31] Gleyzes P, Boccara A C, Saint-Jalmes H. *Optics Letters*, 1997, 22: 1529.
- [32] Hisashi Shimizu, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 9802.
- [33] Stéphane Berciaud, Laurent Cognet, Gerhard A Blab, et al. *Physics Review Letters*, 2004, 93: 257402.
- [34] Stéphane Berciaud, David Lasne, Gerhard A Blab, et al. *Physical Review B*, 2006, 73: 045424.
- [35] Cognet L, Lounis B. *Gold Bulletin*, 2008, 41(2): 139.
- [36] Stéphane Berciaud, Laurent Cognet, Philippe Tamarat, et al. *Nano Letters*, 2005, 5: 515.
- [37] Stéphane Berciaud, Laurent Cognet, Brahim Louni. *Nano Letters*, 2005, 5: 2160.
- [38] Stéphane Berciaud, Laurent Cognet, Brahim Lounis. *Physical Review Letters*, 2008, 101: 077402.
- [39] Stéphane Berciaud, Laurent Cognet, Philippe Poulin, et al. *Nano Letters*, 2007, 7: 1203.
- [40] Jay Giblin, Muhammad Syed, Michael T Banning, et al. *ACS Nano*, 2010, 4: 358.
- [41] Gaiduk A, Yorulmaz M, Ruijgrok P V, et al. *Science*, 2010, 330: 353.
- [42] Mustafa Yorulmaz, Sara Nizzero, Anneli Hoggard, et al. *Nano Letters*, 2015, 15: 3041.
- [43] Cognet L, Tardin C, Boyer D, et al. *PNAS*, 2003, 100: 11350.
- [44] David Lasne, Gerhard A Blab, Stéphane Berciaud, et al. *Biophysical Journal*, 2006, 91: 4598.
- [45] David Lasne, Gerhard A Blab, Francesca De Giorgi, et al. *Optics Express*, 2007, 15: 14184.
- [46] Cécile Leduc, Jin-Mi Jung, Randy R Carney, et al. *ACS Nano*, 2011, 5: 2587.
- [47] Zijlstra P, Orrit M. *Rep. Prog. Phys.*, 2011, 74: 106401.
- [48] Peter Zijlstra, Pedro M R Paulo, Michel Orrit. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7: 379.
- [49] Alexander Gaiduk, Paul V Ruijgrok, Mustafa Yorulmaz, et al. *Chem. Sci.*, 2010, 1: 343.
- [50] Ji Won Ha. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2015, 36: 2154.
- [51] Parra-Vasquez A N G, Laura Oudjedi, et al. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, 3: 1400.
- [52] Tina X Ding, Lei Hou, Harmen Van der Meer, et al. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2016, 7: 2524.
- [53] Vivien Oceau, Laurent Cognet, Lauernce Duchesne, et al. *ACS Nano*, 2009, 3: 345.
- [54] Pedro M R Paulo, Alexander Gaiduk, Forian Kulzer, et al. *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113: 11451.
- [55] Miriam Wähnert, Romy Radünz, Frank Cichos. *Proc. of SPIE*, 2009, 7185: 71850V.
- [56] Romy Radünz, Daniel Rings, Klaus Kroy, et al. *J. Phys. Chem. A*, 2009, 113: 1674.
- [57] Markus Selmke, Marco Braun, Frank Cichos. *ACS Nano*, 2012, 6: 2714.
- [58] Markus Selmke, Romy Schachoff, Marco Braun, et al. *RSC Advances*, 2013, 3: 394.
- [59] Nieves D J, Li Y, Ferning D G, et al. *R. Soc. Open Sci.*, 2015, 2: 140454.
- [60] Michael Atlan, Michel Gross, Pierre Desbiolles, et al. *Optics Letters*, 2008, 33: 500.
- [61] Absil E, Tessier G, Gross M, et al. *Optics Express*, 2010, 18: 780.
- [62] Bijesh M M, Shakhi P K, Arunkarthick S, et al. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1643.
- [63] Alket Mërtiri, Thomas Jeys, Vladimir Liberman, et al. *Appl. Phys. Letts.*, 2012, 101: 044101.
- [64] Eun Seong Lee, Jae Yong Lee. *Optics Express*, 2011, 19: 1378.
- [65] Alket Mertiri, Hatice Altug, Mi K Hong, et al. *ACS Photonics*, 2014, 1: 696.
- [66] Zhang Delong, Li Chen, Zhang Chi, et al. *Science Advances*, 2016, 2: e1600521.
- [67] Bai Yeran, Zhang Delong, Li Chen, et al. *J. Phys. Chem. B*, 2017, 121: 10249.
- [68] Li Zhongming, Kyle Aleshire, Masaru Kuno, et al. *J. Phys. Chem. B*, 2017, 121: 8838.
- [69] Rusha Chatterjee, Ilia M Pavlovets, Kyle Aleshire, et al. *The Journal of Physical Chemistry, C*, 2018, 122: 16443.
- [70] Arunkarthick S, Bijesh M M, Geetha K Varier, et al. *Journal of Microscopy*, 2014, 256: 111.
- [71] Markus Selmke, André Heber, Marco Braun, et al. *Applied Physics Letters*, 2014, 105: 013511.
- [72] Hao Shen, Lawrence J Tazuin, Rashad Baiyasi, et al. *Chemical Reviews*, 2017, 117: 7331.



# Application and Development of Photothermal Based Microscopy in Single Particle Detection

LI Shao-hua<sup>1</sup>, ZHAO Hong-xia<sup>1</sup>, WEN Chen<sup>1</sup>, DING Zhi-qun<sup>1</sup>, WANG Jing-ru<sup>1</sup>, CHENG Pei-hong<sup>1, 2\*</sup>

1. School of Electronics and Information Engineering, Ningbo University of Technology, Ningbo 315211, China

2. State Key Laboratory of Silicon Materials, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

**Abstract** High sensitive single particle/molecule detection technique is an important prerequisite for nanoparticle application in biomedicine, chemistry and optoelectronics. Common single particle detection techniques include optical microscopy and spectroscopy based on fluorescence, Raman scattering, Rayleigh scattering, and absorption signals from single particle or molecule. Raman and fluorescence spectra analysis are applicable to fluorescence molecules or molecules with SERS activity. However, even for organic dye and semiconductor nanoparticles with high fluorescence efficiency, inherent photobleaching and blinking is a challenge for single particle detection. Scattering based technique is another solution for single particle detection, but as the scattering signal decreases with the particles size with the sixth power, it is difficult to separate the scattering signal of small size particle from background scattering noise. As we known, the light absorption of medium will induce refractive index change, and a refractive index gradient distribution will be present in the light heating zone. This phenomenon is known as the photothermal effect. Microscopy based on particle or molecule light absorption induced thermal effect has the merit of high sensitivity, freedom from background scattering, in-situ and label-free. It has been demonstrated potential application in single-particle/molecule detection field. In this paper, the application and development of photothermal based microscopy and spectroscopy was summarized. Firstly, the measurement principle was introduced. Then experimental set-ups of several different techniques including photothermal lens, differential interference contrast and photothermal heterodyne were discussed. The signal-noise ratio, sensitivity and resolution of these techniques were compared, and the recent investigations on applications of these techniques to single particle detection were also introduced. And then the recent research progresses in improve photothermal microscopy was elaborated, including signal/noise ratio increasing, dynamic measurement improvement and infrared spectrum expanding. Finally, the challenge for the photothermal technique used in single particle detection was summarized briefly.

**Keywords** Single particle detection; Photothermal microscopy; Photothermal effect

(Received Dec. 26, 2019; accepted Mar. 17, 2020)

\* Corresponding author