

文章编号: 1005-5630(2015)05-0431-05

## 基于 SiO<sub>2</sub> 微球颗粒的成像研究

韩 笑, 杨俊杰, 赖 雪, 单新治, 隋国荣

(上海理工大学 光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

**摘要:** 远场显微成像是近年来的研究热点, 而微球颗粒在远场成像中具有一定的放大作用。针对这种现象, 通过对微球颗粒的分离, 对单个微球颗粒的成像特性进行了理论研究。实验表明, 利用一定尺寸的二氧化硅微球颗粒, 可以使远场显微镜的分辨率提高一倍。在尼康显微镜下, 利用普通卤素灯光源、二氧化硅和相应的增强介质, 对 1 200 线的光栅实现了近一倍的放大成像效果, 证实了微球颗粒的远场显微成像能力。

**关键词:** 远场超分辨成像; 二氧化硅微球; 解团聚; 成像放大

**中图分类号:** TN 205 **文献标志码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1005-5630.2015.05.011

### Imaging research based on SiO<sub>2</sub> microsphere

HAN Xiao, YANG Junjie, LAI Xue, SHAN Xinzhi, SUI Guorong

(School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for  
Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** The far-field super-resolution imaging is a hot spot in the research. It is found that the microsphere played an important role in the far-field imaging. We design an experiment to realize de-aggregation of microsphere, and theoretically study imaging characteristics of single microsphere. According to the experimental research, we can double the resolution of far-field microscope by utilizing a specific scale of silica microsphere. By using the Nikon microscope with the halide lamp under the silica microsphere and relevant enhanced-medium, we double the imaging effect of a 1 200 line optical grating, and it shows the far-field imaging efficiency of microsphere.

**Keywords:** far-field super-resolution imaging; silica microsphere; de-aggregation; amplified imaging

### 引 言

随着 21 世纪科技发展, 人类对显微成像提出了更高的要求。尤其在生命科学、纳米技术与生物医学等领域, 对百纳米尺度下的观测、操纵和加工等提出了更高的要求<sup>[1]</sup>。早在 1873 年, Abbe<sup>[2]</sup> 利用衍射理论提出了衍射分辨极限, 指出了远场光学显微镜的分辨率受限于衍射效应和数值孔径。为了提高分辨率, 科学界提出了近场扫描的显微成像模式, 其中包括电子扫描显微镜<sup>[3-6]</sup> 和光学扫描显微镜<sup>[7-12]</sup>。这些

收稿日期: 2014-12-30

基金项目: 上海理工大学国家基金培育计划项目(3212302007)

作者简介: 韩 笑(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事光学显微成像与光学工艺方面的研究。E-mail: hanxiao19870322@163.com

通信作者: 隋国荣(1974—), 男, 副教授, 主要从事光电检测与图像处理、微纳米高速光器件、光通讯技术、自动控制理论、信号与系统方面的研究。E-mail: suigr@usst.edu.cn

显微镜技术不受衍射极限的限制,实现了纳米甚至亚纳米的分辨率。但是这些近场扫描技术也存在一些弊端而无法广泛使用到生物、医学等领域。作为生物、医学领域广泛使用的远场显微成像技术,提高分辨率通常有两个方法:其一是尽可能选择短的照明波长,如紫外光、X 射线等<sup>[13-14]</sup>;其二是提高数值孔径。前者对生物细胞容易产生影响,且不容易控制;后者则受限于工艺,因此传统远场显微成像技术很难实现在普通可见光下的百纳米超分辨成像。为此,科学界又先后提出了多光子吸收超分辨技术<sup>[15]</sup>、受激发射损耗显微技术<sup>[16]</sup>、随机光学重建显微技术<sup>[17]</sup>、饱和激发<sup>[18]</sup>、结构光照明显微技术<sup>[19]</sup>、荧光激活定位显微技术<sup>[20]</sup>和各种超透镜显微技术<sup>[21-22]</sup>等多种远场显微成像技术,并取得了一定的进展,为远场超分辨成像提供了可能。随着对工艺和理论的研究深入,有学者提出了利用二氧化硅微米球颗粒进行超分辨成像技术<sup>[23]</sup>,该技术可以在 600 nm 可见光的照射下,通过在样品表面铺撒二氧化硅微米球颗粒从而实现 $\lambda/10$ 的远场分辨率。该技术具有重要的应用价值,但其理论以及实验工艺还存在一定的研究空间。

在完成了二氧化硅颗粒解团聚的基础上,本文通过实验研究了微米球对 1 200 线光栅表面微结构的成像特性。

### 1 微球成像原理

根据光线折射定律,构建了微球的成像模型,如图 1 所示,使平行于光轴的光线经过微球汇聚于焦点  $F'$ ,微球焦距为  $f'$ 。设微球半径为  $r$ ,折射率为  $n$ ( $n$  为相对于外界的折射率,如果微球置于空气中,则  $n$  为微米球自身折射率 1.56;若浸没在液体中,则  $n$  为微球折射率与液体折射率的比值),则焦距  $f'$  可表示为<sup>[24]</sup>

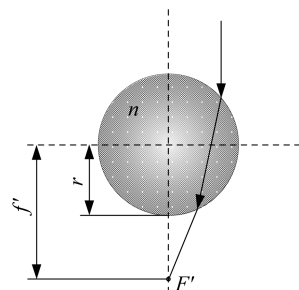


图 1 二氧化硅微米球成像原理图  
Fig. 1 Principle of silica microsphere

$$f' = \frac{rn}{2(n-1)} \tag{1}$$

根据物距  $l$ 、像距  $l'$  以及焦距  $f$  之间的关系

$$\frac{1}{l'} - \frac{1}{l} = \frac{1}{f'} \tag{2}$$

由此可得微球的放大倍率  $M$  以及像距  $l'$  的表达式

$$\begin{cases} M = \frac{l'}{l} = \frac{n}{2-n} \\ l' = \frac{nr}{n-2} \end{cases} \tag{3}$$

当微球放置在样品表面时,物距  $l = -r$ ,则可以求出像距  $l'$ ,由此可以求出不同条件下样品经微球成像的位置,方便人们在使用显微镜观察时,快速对焦,找到成像最清晰的像面。

由式(3)可知,微球的放大倍率只和相对折射率  $n$  有关,和半径  $r$  无关,且随着相对折射率的增大而增大,当微球浸没在空气中时,放大倍率最大。但是焦距的大小同时受相对折射率  $n$  和微球半径  $r$  的影响,因此可以通过调整  $n$ 、 $r$  两个参数调节焦距,提高聚焦能力,改善成像分辨率。

## 2 实验设计

### 2.1 成像系统及光栅

根据微球成像理论,构建了远场显微观测系统,并对二氧化硅微米球颗粒成像观测,其系统结构图如图 2 所示。图中远场显微成像部分采用 Axio Imager M2 卡尔蔡司正置显微镜,其物镜的放大倍率为  $100\times$ ,数值孔径为 0.9。系统工作在反射模式,置顶的 CCD 用来成像。其照明光源为卤素灯,中心波长在 600 nm 左右。光经物镜照射在样品上,反射后再经物镜传达至显微镜顶部的 CCD。显微镜的横向分辨率公式为

$$N = \frac{0.61\lambda}{NA} \tag{4}$$

式中: $\lambda$ 为照明光源波长; $NA$ 为物镜数值孔径。

由此可计算出系统的光学横向分辨率为300~400 nm。为了与相关的工作进行对比,对观测样品,选用了同样的1 200线进口光栅,其特性尺寸恰能被显微镜分辨,这样的选择既方便与相应的工作对比,同时也有利于在不同的手段下的成像效果对比和调焦。

首先需要利用远场显微镜对光栅进行初始观测,并将该数据用于后期的实验对比。先对光栅进行处理,清洗光栅不能只用氮气或者干净空气吹其表面,还需要配合超声振荡等工艺。将光栅悬置在装有去离子水的烧杯内,光栅面朝下。然后将烧杯放在超声波发生器内,超声振荡10 min,这样可同时清洗掉光栅表面附着的微米球颗粒。振荡完毕后取出光栅放在培养皿内(无盖),将培养皿放在烘箱内,在30℃左右温度下烘30 min。烘干后用氮气吹干净光栅表面,将光栅放在培养皿里待用。完成光栅清洗后,调节好远场显微镜,选择适当的物镜,调节光源和焦距等,然后取出光栅进行成像观测。图3显示了在该显微观测系统下,观测到的光栅效果图。

从图中可以看出,通过显微镜分辨310 nm和510 nm的光栅刻线与光栅刻线间隔,效果并不理想,且无法更好地分辨更小的细节,但仍然可以实现该尺寸的分辨成像。同时实验结果也印证了该显微镜的分辨率与计算值一致。

## 2.2 解团聚与微球成像实验

由理论分析知,利用微球可以很好地提高成像分辨率,通过微球作用产生的放大虚像可提高成像品质和对细节的把握。要进行微球实验,首先需要活动单颗粒微球,为此需对已有的颗粒进行解团聚,使其在保持原本物理和化学特性的基础上,以单颗粒微球个体存在。通过一系列的实验,实现了对团聚和二次团聚颗粒的解团聚,并获得性能良好且可以长期保存的单微球颗粒。本文采用的样品微米球为直径5.1  $\mu\text{m}$ 的SiO<sub>2</sub>微米球,其折射率为1.56。因为无法直接将微米球平铺在样品光栅上,因此使用实验室获得的直径5  $\mu\text{m}$ 的二氧化硅微球的解团聚溶液,用微量进样器在超净工作台上滴取20  $\mu\text{L}$ 到样品光栅表面。将该带有微球颗粒的样品片放入高精度恒温烘箱,取出液体后放置于远场显微镜下,保持物镜、光源不变,调节焦距,得到图4所示的单颗粒微球的远场成像效果图。

从图4可以看出,利用直径5.1  $\mu\text{m}$ 的干燥SiO<sub>2</sub>微球并没有取得更好的成像效果。这点与之前的理论分析有一定的出入,说明利用微球进行超分辨成像并不能简单地利用几何光学进行分析。通过进一步的理论分析可知,当光源照射到样品表面后,会在其表面激发传导波和倏逝波,其中传导波主要携带的是样品的强度信息,而倏逝波则携带了精细结构的信息,倏逝波在沿垂直于样品表面的传播方向上呈指数衰减,只能实现波长级的传导。由于信息的损失使远场显微镜无法获得相应的结构信息,因此无法实现超分辨成像。为此,以往有大量的工作考虑通过增强倏逝波或将倏逝波转化为传导波的方式来实现之前射线理论分析的放大倍数,从而提高成像分辨率<sup>[21-26]</sup>。本文采用了无水乙醇作为倏逝波增强剂,并进行了对比试验,其成像结果如图5所示。

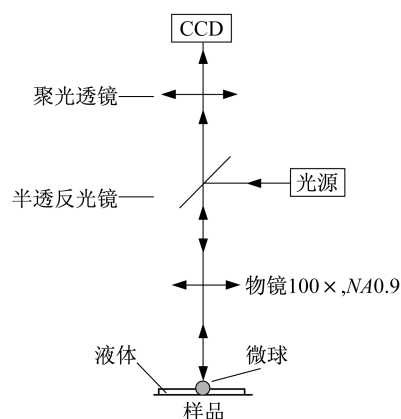


图2 远场显微系统结构图

Fig. 2 Structure of far-field microscopy system

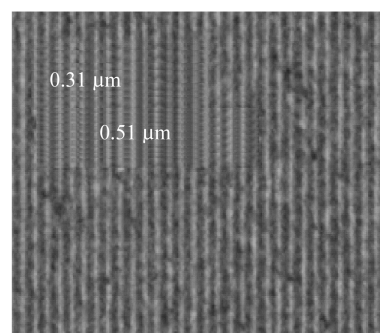


图3 光栅表面成像图

Fig. 3 Image of grating surface

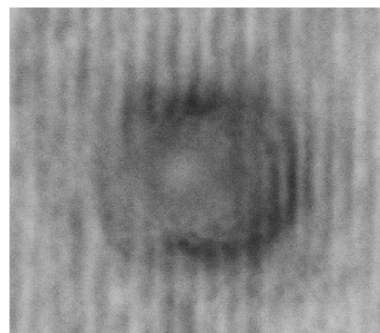


图4 光栅表面微球成像图

Fig. 4 Image of grating surface with microsphere

图 5 显示出了良好的放大和成像效果,实验所用微球的相对折射率  $n=1.56/1.36=1.147$ ,在全浸没状态下,代入公式可得放大倍率  $M=1.345$ ,像距  $l'=-1.345r$ ,取微球半径  $r=2.50\ \mu\text{m}$ ,则  $l'=-3.36\ \mu\text{m}$ ,即像面在样品表面下  $0.86\ \mu\text{m}$  左右的地方。因为微米球在制造上有一定的误差,所以像面的位置也在标准值的附近,能与之前的射线理论分析结果相吻合,基本达到了预期的成像结果。

### 2.3 实验结果分析

通过实验对比,可以看出仅用微球颗粒进行成像,并不能实现射线理论分析的放大和分辨要求,但通过加入无水乙醇进行倏逝波的增强后,其结果就得到了大幅度改善,完全能够实现射线理论分析的结果。此外通过与国外相同实验对比<sup>[27]</sup>,也取得了较好的效果,其对比结果如图 6 所示。

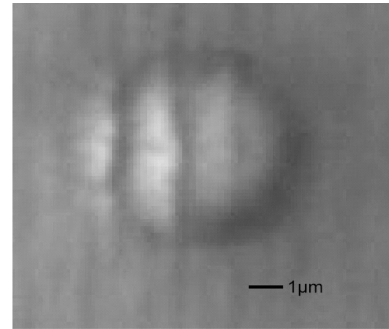
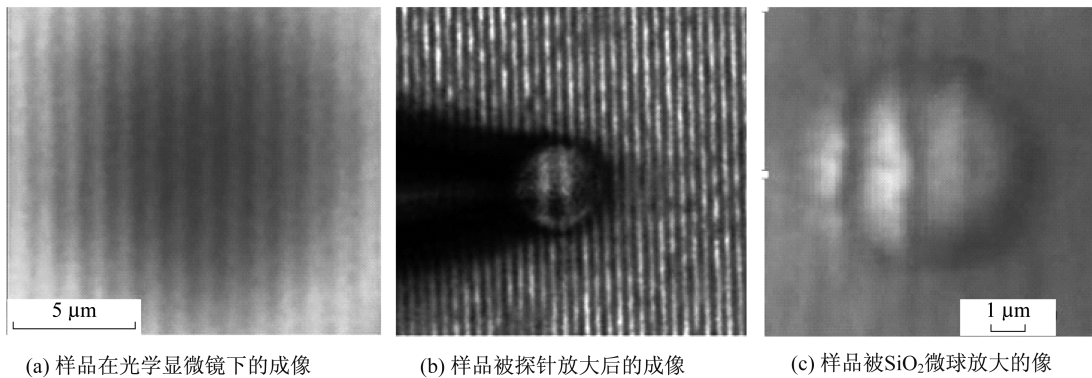


图 5 光栅表面浸润无水乙醇微球成像图  
Fig. 5 Image of grating surface with microsphere immersing into the absolute ethyl alcohol



(a) 样品在光学显微镜下的成像

(b) 样品被探针放大后的成像

(c) 样品被SiO<sub>2</sub>微球放大的像

图 6 成像对比图

Fig. 6 The contrast figure of imaging

### 3 结 论

通过对相关文献的研究,建立了理论模型并进行了分析。在实验中,首先完成了团聚颗粒的解团聚,使颗粒保持了很好的物理及化学特性。在此基础上,分别进行了干燥微球超分辨成像技术的实验,但实验没有达到预期的理论效果。通过对工艺和浸润介质的研究,以及对成像特性进行了深入分析,利用无水乙醇进行倏逝波的增强,获得了与理论相符的成像效果,同时通过对比,得到了比文献<sup>[27]</sup>中同种尺寸下更好的成像效果,为后期更小尺寸的研究打下了基础,具有一定的应用价值。

### 参考文献:

[ 1 ] MAO Z L, WANG C, CHENG Y. Superresolution far-field fluorescence bio-imaging: breaking the diffraction barrier[J]. Chinese Journal of Lasers, 2008, 35(9): 1283-1307.

[ 2 ] ABBE E. Contributions to the theory of the microscope and that microscopic perception[J]. Archiv. Für Mikroskopische Anatomic, 1843, 9: 413-468.

[ 3 ] YANG J T, XU W D. Scanned-cantilever atomic force microscope with large scanning range[J]. Chinese Optics Letters, 2006, 4(10): 580-582.

[ 4 ] YANG J T, XU W D. Design of optical tracking for scanned cantilever atomic force microscope[J]. Chinese Journal of Lasers, 2006, 33(1): 26-30.

[ 5 ] WU S F, ZAHNG J, PAN S, et al. Photon scanning tunneling microscope combined with atomic force microscope[J]. Acta Optica Sinica, 2005, 25(8): 1099-1104.

[ 6 ] BINNIG G, ROHRER H, GERBER C, et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy[J]. Physical Review Letters, 1982, 49

- (1):57-61.
- [7] SYNGE E H. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region[J]. *Philosophical Magazine*, 1928, 6(35):356-362.
- [8] MICHAELIS J, HEFTICH C, MLYNE J, et al. Optical microscopy using a single molecule light source[J]. *Nature*, 2000, 405(6784): 325-328.
- [9] ZHENG J Y, YU X M, ZHANG T H, et al. Research of surface plasmon resonance on goldfilm using scanning near-field optical microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, 26(8):1236-1239.
- [10] LIU C, YAN C C, GAO S M. Detection angle and polarization dependences of the interferometric imaging with near-field scanning microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, 26(3):425-429.
- [11] XY T J, XU J Y, WANG J, et al. Numerical analysis of interaction and perturbation between evanescent field and probe in optical field detection by SNOM[J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, 25(1):165-469.
- [12] TOOMRE D, MANSTEIN D J. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy[J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11(7):298-303.
- [13] ATTWOOD D. New opportunities at soft-X-ray wavelengths[J]. *Physics Today*, 1992, 45(8):24-31.
- [14] MATZ M V, FRADKOV A F, LABAS Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10):969-973.
- [15] ELANGOVA M, WALLRABE H, CHEN Y, et al. Characterization of one-and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy[J]. *Methods*, 2003, 29(1):58-73.
- [16] 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.
- [17] ZHUANG X W. Nano-imaging with STORM[J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(7):365-367.
- [18] HEINTZMANN R, JOVIN T M, CROMER C. Saturated patterned excitation microscopy: a concept for optical resolution improvement[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2002, 19(8):1599-1609.
- [19] GUSTAFSSON M G L. Doubling the lateral resolution of wide field fluorescence microscopy using structured illumination[J]. *SPIE*, 2000, 3919:141-150.
- [20] 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.
- [21] ZHANG X, LIU Z W. Superlenses to overcome the diffraction limit[J]. *Nature Materials*, 2008, 7(6):435-441.
- [22] LU D L, LIU Z W. Hyperlenses and metalenses for far-field super-resolution imaging[J]. *Nature Communications*, 2012, 3(11):2176-2184.
- [23] 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(3):218.
- [24] KU Y L, KUANG C F, HAO X, et al. Superenhanced three-dimensional confinement of light by compound metal-dielectric microspheres[J]. *Optics Express*, 2012, 20(15):16981-16991.
- [25] HAO X, KUANG C F, LI Y H, et al. Hydrophilic microsphere based mesoscopic-lens microscope (MMM) [J]. *Optics Communications*, 2012, 285(20):4130-4133.
- [26] KUANG C F, LIU Y, HAO X, et al. Creating attoliter detection volume by microsphere photonic nanojet and fluorescence depletion [J]. *Optics Communications*, 2012, 285(4):402-406.
- [27] KRIVITSKY L A, WANG J J, WANG Z B, et al. Locomotion of microspheres for super-resolution imaging[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3:3501.

(编辑:刘铁英)