

基于微球透镜的任选区高分辨光学显微成像新方法研究*

王淑莹 章海军 张冬仙[†]

(浙江大学, 现代光学仪器国家重点实验室, 杭州 310027)

(2012年6月19日收到; 2012年7月18日收到修改稿)

提出和发展了基于毛细管-微球组合探针的任选区、高分辨显微成像新方法. 建立了微球显微成像的物理模型, 利用成像理论, 推导出微球成像的放大倍率; 采用 3.0, 4.4, 5.6, 7.5, 10.0 μm 等不同直径的 SiO_2 微球, 对未经刻录的 DVD 光盘进行了微球显微成像实验, 可以观察到 DVD 光盘的微纳米结构被明显放大且对比度显著提高, 与理论计算结果相符合; 采用毛细管微探针操纵微球的方法, 实现了基于微球透镜阵列的样品微纳米结构的高分辨显微成像; 在此基础上, 进一步将毛细管微探针与微球组合, 制备出毛细管-微球组合型探针, 首次实现了基于微球透镜的样品任意区域高分辨显微成像.

关键词: 微球, 显微成像, 毛细管-微球组合探针, 高分辨

PACS: 42.79.Bh, 42.30.Va, 07.79.-v, 42.40.Lx

DOI: 10.7498/aps.62.034207

1 引言

在微纳米显微成像技术中, 光学显微镜无疑是应用数量最多、应用领域最广的显微成像工具. 虽然透射电子显微镜 (TEM)^[1]、扫描电子显微镜 (SEM)^[2]、扫描隧道显微镜 (STM)^[3]、原子力显微镜 (AFM)^[4]、扫描近场光学显微镜 (SNOM)^[5] 等的分辨率可达到纳米甚至原子量级, 不过, TEM 和 SEM 需要在真空下工作, 无法适用于活体样品的现场观察^[6]; STM 则要求样品具有导电性, 因而只能适用于导体和半导体样品, 而且也往往需要在真空条件下工作^[7]; AFM 虽然可同时适用于导体、半导体与绝缘体样品, 而且可以在气体与液体等环境下工作, 但是它获得的是经过原子力—微悬臂偏转量—光斑移动量—光电转换—电学放大—图像重构等转换的扫描图像, 而不是实时与直接观察到的现场图像^[8-9]; SNOM 的扫描成像过程与 AFM 类似, 获得的也是经过多次转换的扫描图像, 同样无法实现样品的实时与直接观察^[10]. 因此, 就

实时性、直接性及普适性而言, 光学显微成像技术仍有其不可替代的优越性.

近年来, 国内外研究者采用负折射率材料^[11]、环形光锥照明^[12]及在样品表面播撒微球^[13]等方法, 开展了各种新型光学显微成像技术的研究, 它们的特点是可以实时获得样品的高分辨显微图像. 据文献报道, 将微球播撒在样品表面的显微成像方法, 其横向分辨率可显著提高. 不过, 有关这一显微成像方法的物理机理的研究尚较缺乏; 其次, 现有的微球播撒方式是随机的, 完全无法控制其播撒的区域, 也即无法有意识地对感兴趣的样品区域进行显微观察和成像, 而只能随机和孤立地观察到撒有微球的样品表面区域 (微球正下方的区域); 此外, 微球播撒在样品表面之后, 无法再清理干净, 这无疑会对样品造成损伤和污染. 因此, 还需要在理论、方法和技术等方面开展进一步研究.

为此, 本文对微球显微成像方法开展了深入的理论和实验研究, 实现了基于不同直径的微球及微球阵列的显微成像, 在此基础上, 提出和发展了基于毛细管-微球组合探针的高分辨显微成像方法,

* 国家自然科学基金 (批准号: 51077117, 11179026) 和浙江省自然科学基金 (批准号: Z1110196) 资助的课题.

[†] 通讯作者. E-mail: zhangdx@zju.edu.cn

首次实现了样品任意区域的高分辨显微成像. 这些研究工作, 是对微球显微成像技术的拓展与创新, 为今后的实际应用提供理论和技术基础.

2 原理与方法

微球透镜的光学成像特性及其与常规显微物镜配合实现高分辨显微成像的原理如图 1 所示.

在图 1(a) 中, 设微球透镜的焦距为 f' , 折射率 n , 半径 r , 则有

$$f' = \frac{nr}{2(n-1)}, \quad (1)$$

根据物距 l , 像距 l' 与焦距 f' 的关系式

$$\frac{1}{l'} - \frac{1}{l} = \frac{1}{f'}, \quad (2)$$

可推导出微球的成像放大倍率 M

$$M = \frac{l'}{l} = \frac{f'}{l+f'}. \quad (3)$$

当微球播撒在样品表面时 (图 1(b)), $d = 0$, 物距 l 为

$$l = -(r+d) = -r, \quad (4)$$

将 (1) 式与 (4) 式代入 (3) 式, 可得:

$$M = \frac{nr/2(n-1)}{-r+nr/2(n-1)} = \frac{n}{2-n}. \quad (5)$$

由 (5) 式可知, 当样品位于微球下端面时, 微球对样品的放大倍率 M 与微球直径 (或半径 r) 无关. 已知 SiO_2 微球的折射率约为 $n = 1.46$, 计算得到 $M = 2.7$.

因此, 采用 SiO_2 微球, 可预先将样品的微纳米结构放大约 2.7 倍 (一次放大); 然后, 经过后续的常规显微物镜接收, 再将微球视场内的样品结构进一步放大 (二次放大), 从而获得比采用相同显微物镜时更高的放大倍率和更高的分辨率, 为实现微纳米样品的超分辨成像提供了新途径.

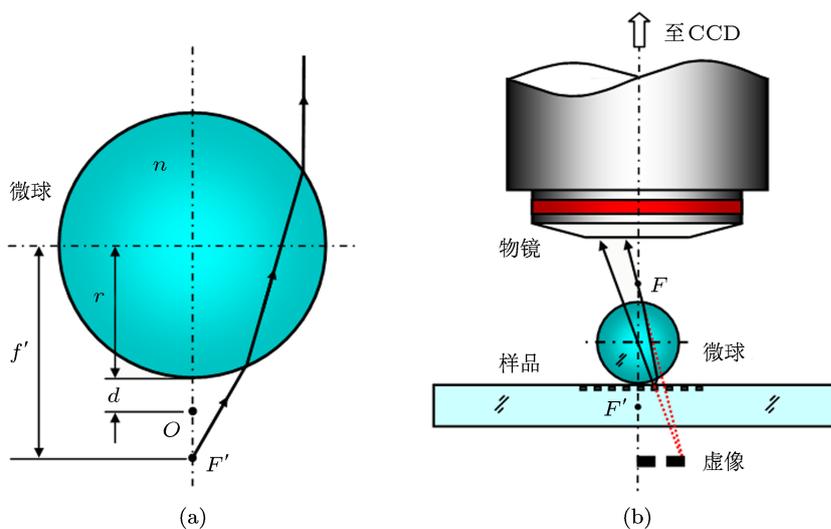


图 1 基于微球的高分辨成像原理图 (a) 微球及其成像特性图解; (b) 微球与常规显微物镜配合的高分辨 (高倍率) 显微成像示意图

3 实验及结果

为验证上述理论及微球显微成像方法的可行性, 采用 3.0, 4.4, 5.6, 7.5, 10.0 μm 等不同直径的 SiO_2 微球, 对未经刻录的 DVD 光盘 (预先将光盘夹层打开使其微结构位于表面) 进行了微球显微成像实验, 实验在透射型显微镜上进行, 采用 $40\times$, $NA = 0.65$ 的物镜作为后续物镜, 由 CCD 及图像采集卡将来自物镜的显微图像输入计算机进行视频

观察和测量. 部分实验结果如图 2 所示.

从图 2(a), (c), (e) 可以看出, DVD 光盘的微纳米结构 (未撒微球的区域) 很不明显. 可见, 在本实验中, 仅采用常规 $40\times$ 显微物镜很难直接观察到 DVD 的微纳米结构. 将显微物镜向下微调直至微球本身的边界变得模糊, 而微球视场内的 DVD 结构变得清晰, 此时, 可以观察到尺寸被明显放大且对比度显著提高的微纳米结构, 如图 2(b), (d) 和 (f) 所示.

以直径 $10\ \mu\text{m}$ 的微球显微成像为例, 在微球本身的视场范围内, 可以观察到约 5 对黑白条纹 (图 2(f)), 即 5 个周期的 DVD 线对, 每一线对的像的周期为 $10/5 = 2.0\ \mu\text{m}$, 而已知 DVD 线对的实际周期为 $0.74\ \mu\text{m}$, 可得微球对样品的放大倍率 M 为 $2.0/0.74 = 2.7$ 倍, 同理, 采用其他直

径的微球得到的放大倍率也在 2.7 倍左右, 因此, 实验结果与上述理论计算的放大倍率值良好符合.

在此基础上, 采用毛细管微探针操纵直径 $7.5\ \mu\text{m}$ 的微球的方法, 实现了基于微球透镜或微球透镜阵列的高分辨显微成像, 如图 3 所示.

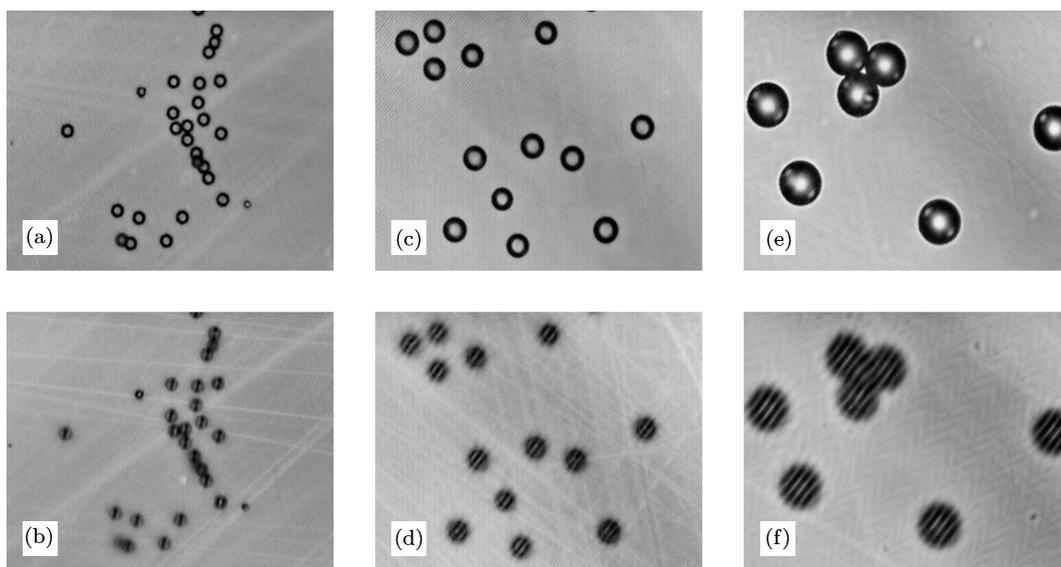


图 2 不同直径的微球对蓝光 DVD 的显微成像 (a), (b) 微球直径 $3.0\ \mu\text{m}$; (c), (d) 微球直径 $5.6\ \mu\text{m}$; (e), (f) 微球直径 $10.0\ \mu\text{m}$

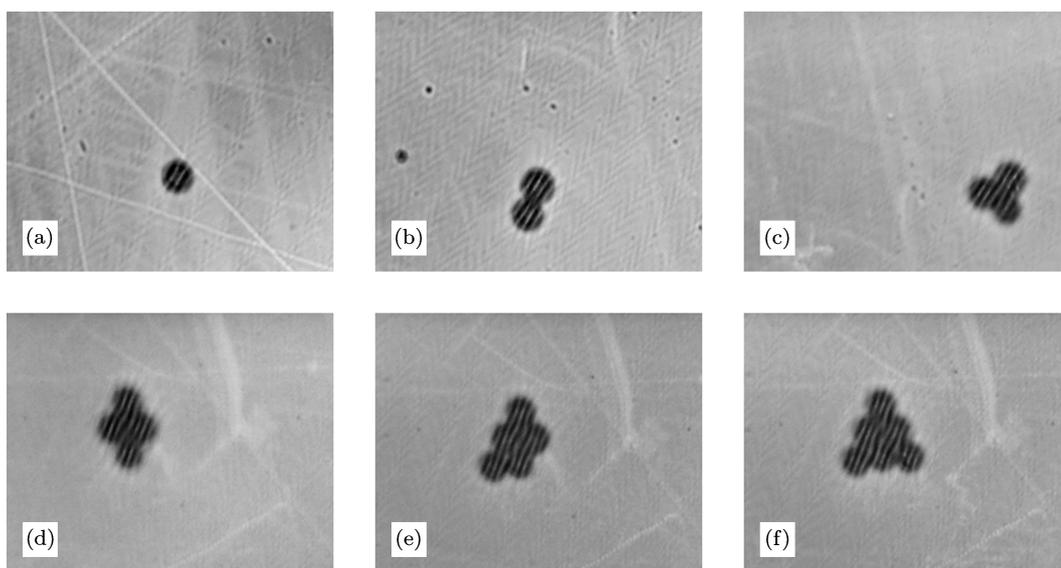


图 3 不同数目的微球排列及其对样品的高分辨显微成像 (微球直径 $7.5\ \mu\text{m}$)

为了方便而且快捷地对样品任意区域进行微球高分辨显微成像, 我们通过微纳米操纵方法进一步将微球粘结在毛细管微探针的尖端处, 由此制作了毛细管-微球组合型探针, 采用微调机构使微探针与样品之间在横向相对移动, 如同手持一把超微细的“微球放大镜”, 从而实现样品任意区域的高分辨显微成像. 图 4 所示为采用毛细管-微球组合型探针对 DVD 光盘进行全区域微球显微成像的视

频截图. 需要指出, 当后续的显微物镜对经微球放大后的样品结构对焦清晰时, 微球本身及毛细管是离焦的, 但这不影响微球对样品的成像. 采用这一方法, 既基于微球实现了高分辨显微成像, 又巧妙地利用微探针的夹持作用, 使微球不再是随机播撒在样品表面, 也不再只能对播撒有微球的孤立样品区域进行观察, 而是能够对感兴趣的任意样品区域乃至全样品区域实现高分辨显微成像.

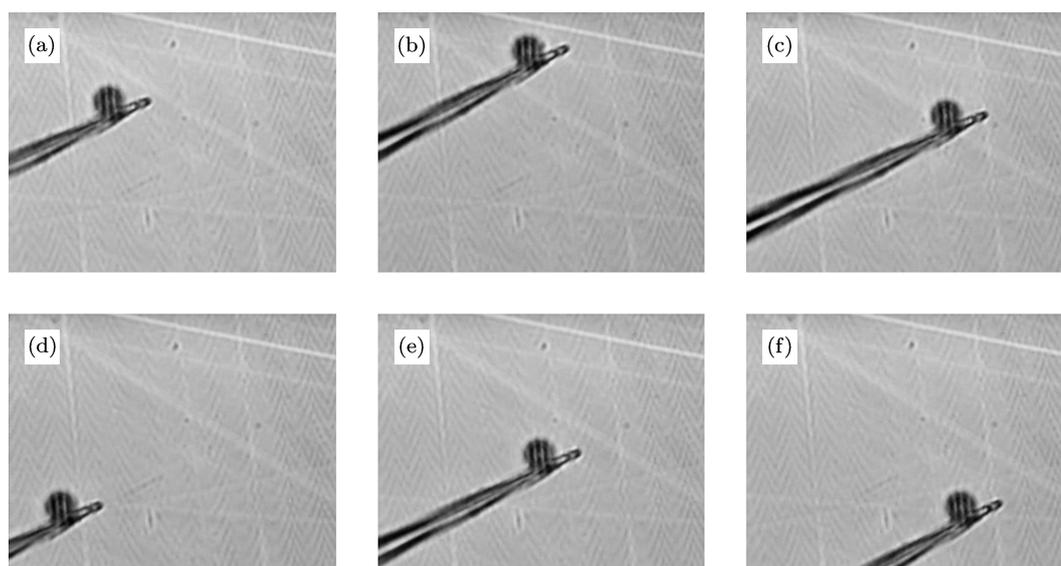


图 4 用毛细管-微球组合型探针对样品不同区域的高分辨显微成像 (视频截图)

4 结论

本文对微球显微成像方法开展了深入的理论和实验研究, 首次提出和实现了基于毛细管-微球组合探针的任选区、高分辨显微成像技术, 通过物理模型和理论计算, 推导出微球成像的放大倍率公式, 从理论上证明当样品位于 SiO_2 微球下端面时可预先将样品的微纳米结构放大约 2.7 倍; 经过后续的常规显微物镜对微球视场内的样品结构二次放大, 最终获得比仅采用相同显微物镜时更高的放

大倍率 (即提高 2.7 倍); 据此建立了基于 SiO_2 微球透镜的高分辨显微成像系统, 采用 $3.0\text{--}10.0\ \mu\text{m}$ 的几种不同直径的 SiO_2 微球, 将其直接播撒在样品表面或排成微球阵列, 对未经刻录的 DVD 光盘进行了微球显微成像实验, 得到与理论相符的实验结果; 在此基础上, 进一步将毛细管微探针与微球组合, 制作了毛细管-微球组合型探针, 首次实现了样品任意区域的高分辨显微成像, 为这一技术方法的真正意义上的实用化提供了理论与技术基础.

[1] Coene W, Janssen G 1992 *Phys. Rev. Lett.* **69** 3743

[2] Reimer L 2000 *Scanning Electron Microscopy* (Berlin: Springer-Verlag) p12

[3] Binnig G, Rohrer H 1982 *Helev Phys. Acta* **55** 726

[4] Binnig G, Quate C F, Gerber C 1986 *Phys. Rev. Lett.* **56** 930

[5] Betzig E, Trautman J K 1992 *Science* **257** 189

[6] Ziela R, Hausa A, Tulkeb A 2008 *J. Membrane Sci.* **323** 241

[7] Xiao B, Feng J, Chen J C, Yan J K, Gan G Y 2008 *Acta Phys. Sin.* **57** 3769 (in Chinese) [肖冰, 冯晶, 陈敬超, 严继康, 甘国友 2008 物理学报 **57** 3769]

- [8] Shi B, Zhang H J, Wu L, Zhang D X 2012 *Spectrosc. Spect. Anal.* **32** 993 (in Chinese) [史斌, 章海军, 吴兰, 张冬仙 2012 光谱学与光谱分析 **32** 993]
- [9] Fu X, Zhang H J, Zhang D X 2011 *Microsc. Res. Techniq.* **74** 1058
- [10] Wang Z Y, Li Q, Zhao J, Guo J H 2000 *Acta Phys. Sin.* **49** 1959 (in Chinese) [王子洋, 李勤, 赵钧, 郭继华 2000 物理学报 **49** 1959]
- [11] Melville D O S, Blaikie R J 2005 *Opt. Express* **13** 2127
- [12] Zhi S T, Zhang H J, Zhang D X 2011 *Acta Phys. Sin.* **61** 024207 (in Chinese) [支绍韬, 章海军, 张冬仙 2011 物理学报 **61** 024207]
- [13] Wang Z B, Guo W, Li L, Boris L Y C, Khan A, Liu Z, Chen Z, Hong M 2011 *Nat. Commun.* **2** 218

Location-free optical microscopic imaging method with high-resolution based on microsphere superlenses*

Wang Shu-Ying Zhang Hai-Jun Zhang Dong-Xian[†]

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

(Received 19 June 2012; revised manuscript received 18 July 2012)

Abstract

In this paper, we propose a novel location-free high-resolution optical microscopic imaging method based on micropipette-microsphere combined probe. According to optical principle, a physical model is established to determine the value of magnification. With SiO₂ microspheres of different diameters such as 3.0, 4.4, 5.6, 7.5 and 10.0 μm, microscopic imaging experiments are carried out. The results show that the microstructure of un-etched DVD disk can be significantly magnified and the image contrast is obviously improved, which is consistent well with the theoretical calculation. Microscopic imaging of microstructures based on SiO₂ microsphere array is realized by controlling the microspheres with a micropipette. Furthermore, a kind of micropipette-microsphere combined probe is prepared, by which location-free high-resolution optical microscopic imaging has implemented for the first time.

Keywords: microsphere, microscopic imaging, micropipette-microsphere combined probe, high-resolution

PACS: 42.79.Bh, 42.30.Va, 07.79.-v, 42.40.Lx

DOI: 10.7498/aps.62.034207

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 51077117, 11179026) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No. Z1110196)

[†] Corresponding author. E-mail: zhangdx@zju.edu.cn