

激光直写玻璃基平面波导用于荧光成像*

张林峰¹⁾²⁾ 丁潇川²⁾ 侯智善^{1)†} 曹宇^{1)2)‡}

1) (温州大学机电工程学院, 浙江省激光加工机器人重点实验室, 温州 325035)

2) (温州大学激光加工机器人国家国际科技合作基地, 温州 325035)

(2022年10月24日收到; 2023年2月2日收到修改稿)

荧光显微成像技术具有标记能力强、信号强度高、实验成本低、成像过程简单且从活体到离体均可成像等特点, 在肿瘤细胞成像、药物分布体内探测等生物学分析成像研究中应用广泛, 但如何同时兼具宽视场和高分辨率是当前荧光显微成像领域的一大难点. 平面硅波导被发现可实现超薄样品大范围成像, 然而其需要溅射沉积或是离子束刻蚀等制备工艺, 相关工艺复杂且设备昂贵. 本文设计了一种基于皮秒激光直写的平面波导型荧光显微装置, 利用皮秒激光刻蚀玻璃表层快速制备微米级沟槽, 进一步通过旋涂 SU-8 光刻胶实现低成本、批量化制备玻璃基平面波导. 通过调整激光加工功率、频率、扫描速度等参数可以定制波导直径和深度. 采用罗丹明 B 荧光分子的显微探测实验, 验证了该激光直写玻璃基平面波导完全满足高分辨率和大视场的生物成像需要, 这种简易快速的加工手段能够有效提升荧光成像领域的经济效益和社会效益.

关键词: 激光刻蚀, 聚合物波导, 荧光显微成像, 消逝场**PACS:** 42.62.-b, 42.70.Ce, 42.70.Jk, 42.82.Et**DOI:** 10.7498/aps.72.20222033

1 引言

近年来, 荧光显微成像技术由于良好的特异性、高的对比度和信噪比等性能优势, 被广泛应用于生物物理学^[1]、神经科学^[2]、细胞学^[3]、分子生物学^[4]等生命科学研究的各个领域. 然而, 传统的荧光显微装置仍存在很多问题, 如: 分辨率低^[5]、成像速度慢^[6]、成像视场小^[7]、光毒性^[8]和光漂白^[9]等相互限制, 使其在亚细胞结构观测^[10]、活体生物超精密成像^[11]和分子结构研究领域的应用^[12]受到了极大的限制. 目前, 许多活体生物光学成像还仅仅停留在仿体和小动物实验阶段, 尚未进入临床应用, 在许多方面仍需进一步改进和完善. 近些年来许多学者对此展开不同的工作, 如王美昌等^[13]提出一种基于数字微镜器件的数字线扫描荧光显微成像

方法和系统, 实现了三维高分辨光切片图像重构; Chen 等^[14]利用微型荧光显微镜技术探索动物大脑和结构动力学; Chatterjee 等^[15]对光片显微镜在生物应用中的最新进展进行了概括; Santi^[16]介绍了光片荧光显微镜的最新进展. 随着更多的发现, 对于荧光显微成像技术的研究也随之深入, 显微镜样式和功能更多元化, 从植物^[17]到动物^[18,19], 从单一光片显微镜^[16,20]到数字扫描显微镜^[21,22]等, 荧光显微装置的功能逐渐完善.

一般的荧光显微镜通过同一物镜实现激发光源的聚焦以及受激荧光的收集探测, 为了提高分辨能力, 需要使用高倍物镜, 这就导致了视场的缩小. 近些年平面波导在荧光成像领域开始渐露头角, 基于全内反射原理, 光从折射率较高的波导介质传播到折射率较低的非电导介质时, 入射光的横向电场和磁场的 Fresnel 传递系数并不为零. 这说明光能全部被反射, 但电磁场从界面延伸到了低折射率介

* 浙江省自然科学基金资助 (批准号: LZ20E050003, LD22E050001) 和温州市基础性科研项目 (批准号: 2022G0025) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: houzs21@wzu.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: yucaoz@wzu.edu.cn

质中, 该电磁场 (即消逝场) 从界面向外随距离成指数衰减, 延伸距离约 100 nm 至一个波长. 王海龙^[23] 基于平面波导的荧光显微装置就利用了消逝场这一特性, 使得待观察样品的受激发光被严格限制在波导消逝场范围内, 辅以低倍数观察镜头, 同时实现了高分辨和大视场显微成像. O'Carroll 等^[24] 和 Lin 等^[25] 针对平面波导型荧光显微镜, 其制造工艺需要在硬涂层上溅射沉积和离子束光刻, 且加工时需要掩膜版^[26], 这样的工艺使其难以实现批量制备乃至工业应用. 由于半导体工艺的限制, 上述波导通常制备在不透明的硅基底上, 又限制了正置荧光显微镜的使用. Anders Kokkvoll Engdahl 等^[27] 报道了一种聚合物基波导用于大视场超分辨率光学显微镜, 主要采用紫外照射和掩模版成型波导, 在利用透明的玻璃基底, 能将聚合物波导用在规模更为广泛的倒立显微镜和光学显微镜上. 基于此, 我们提出了一种激光直写玻璃基平面波导用于荧光成像的方法, 利用波导的消逝场实现荧光分子的近场激发, 进而实现在暗场环境下对荧光分子的纵向高分辨率探测. 具体地, 我们在玻璃基底表面激光刻蚀一步直写制备微米级沟槽, 再旋涂 SU-8 光刻胶形成聚合物波导. 在聚合物波导表面涂覆罗丹明 B(RhB) 荧光颗粒, 采用直接耦合方式将 532 nm 激光输入该波导中, 实现了对 RhB 荧光分子的显微探测. 相较于现用加工工艺, 本文所提出的方法有着突出的成本优势, 还可以通过调整激光加工功率、频率、扫描速度等参数定制波导直径和深度.

2 样品制备

平面波导型显微装置制备所用的红外皮秒激光器 (华日激光, PINE-1064-30 B) 如图 1 所示, 所

用激光光源波长 1064 nm, 脉宽 < 10 ps, 最大单脉冲能量 150 μ J, 重复频率 50 kHz—1 MHz, 配有振镜加工和贝塞尔加工两种方式. 图 2 为刻蚀微沟槽制备波导的工艺示意图, 1 mm 厚的玻璃基底 (载玻片) 用作波导的加工表面和材料支撑. 将玻璃基底先后置于丙酮和酒精中超声清洗, 依次清洗 10 min 以去除表面杂质, 之后置于去离子水中漂洗 5 min, 最后在氮气氛围中干燥. 在玻璃基底上用红外皮秒激光 (频率 400 kHz, 功率 20 W, 扫描速度 20 mm/s) 进行刻蚀预设轨迹的微沟槽, 然后以 SU-8 负性光刻胶为波导主体材料旋涂在微沟槽中. 具体地, 首先将单体 SU-8 以质量 1:8 配比混合溶解在环戊酮中 (降低 SU-8 的黏度, 使旋涂后表面光滑平整, 大幅提高旋涂效果和质量), 然后将玻璃基底放置在旋涂仪上, 利用旋涂仪将该混合溶液在玻璃基底上旋涂成膜 (旋涂速率: 7000 r/min). 最后, 将旋涂后的玻璃基底放置在 95 $^{\circ}$ C 的平板热台上加热 15 min, 这一过程中, 有机溶剂环戊酮挥发, SU-8 将均匀的被涂敷在玻璃片上, 最终得到所需样品.

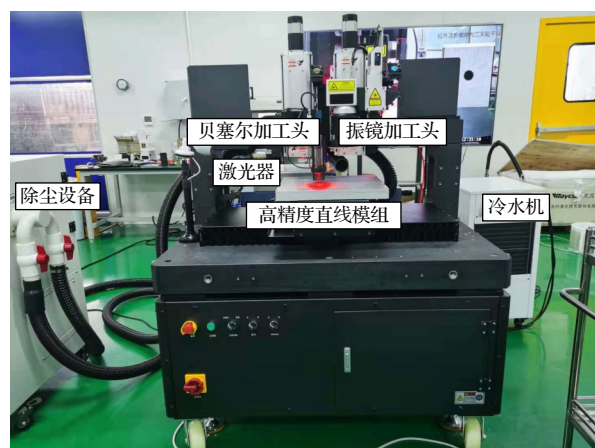


图 1 红外皮秒激光加工平台

Fig. 1. Infrared picosecond laser processing platform.

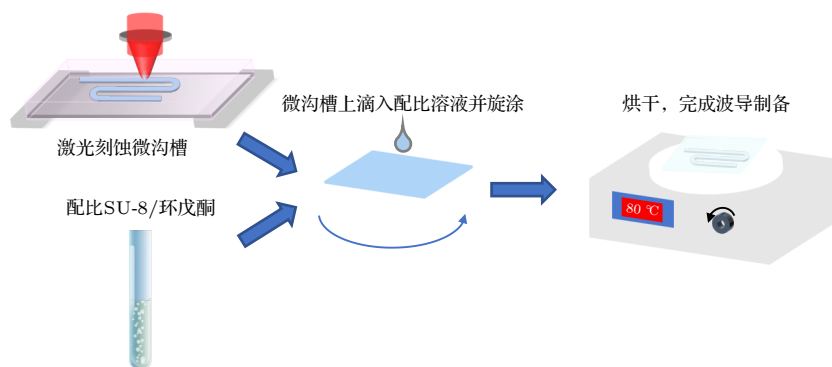


图 2 波导加工工艺流程

Fig. 2. Waveguide processing process.

3 结果与讨论

3.1 聚合物基波导的形貌表征

对聚合物波导来说, 传输损耗尤为重要, 因此使用皮秒激光在玻璃基底上刻蚀的微沟槽如何保证一定的平滑度和完整性就成了关键的问题. 为此, 需要预先研究不同加工参数 (频率、功率) 对微沟槽的表面形貌和刻蚀深度的影响机制, 探究皮秒激光刻蚀玻璃基底微沟槽的优化工艺参数组合. 100 kHz—500 kHz 的激光重复频率范围, 激光功

率区间为 24—30 W, 扫描速度固定为 20 mm/s, 工艺参数试验结果如图 3 所示, 横坐标是微沟槽截面区间, 纵坐标是微沟槽平均深度, 可以看到当激光重复频率过高时, 由于单脉冲能量较低, 激光难以在玻璃表面刻蚀产生痕迹; 而当激光功率过高时, 材料表面热扩散速度低于热累积速度, 加工处将产生明显的热影响区, 伴随着热裂纹和微孔的出现, 微沟槽表面粗糙度增大. 经过探索和优化后的工艺参数组合为重复频率 400 kHz, 扫描速度 20 mm/s, 激光功率 28.5 W (功率密度 4.86 W/cm²). 由于波

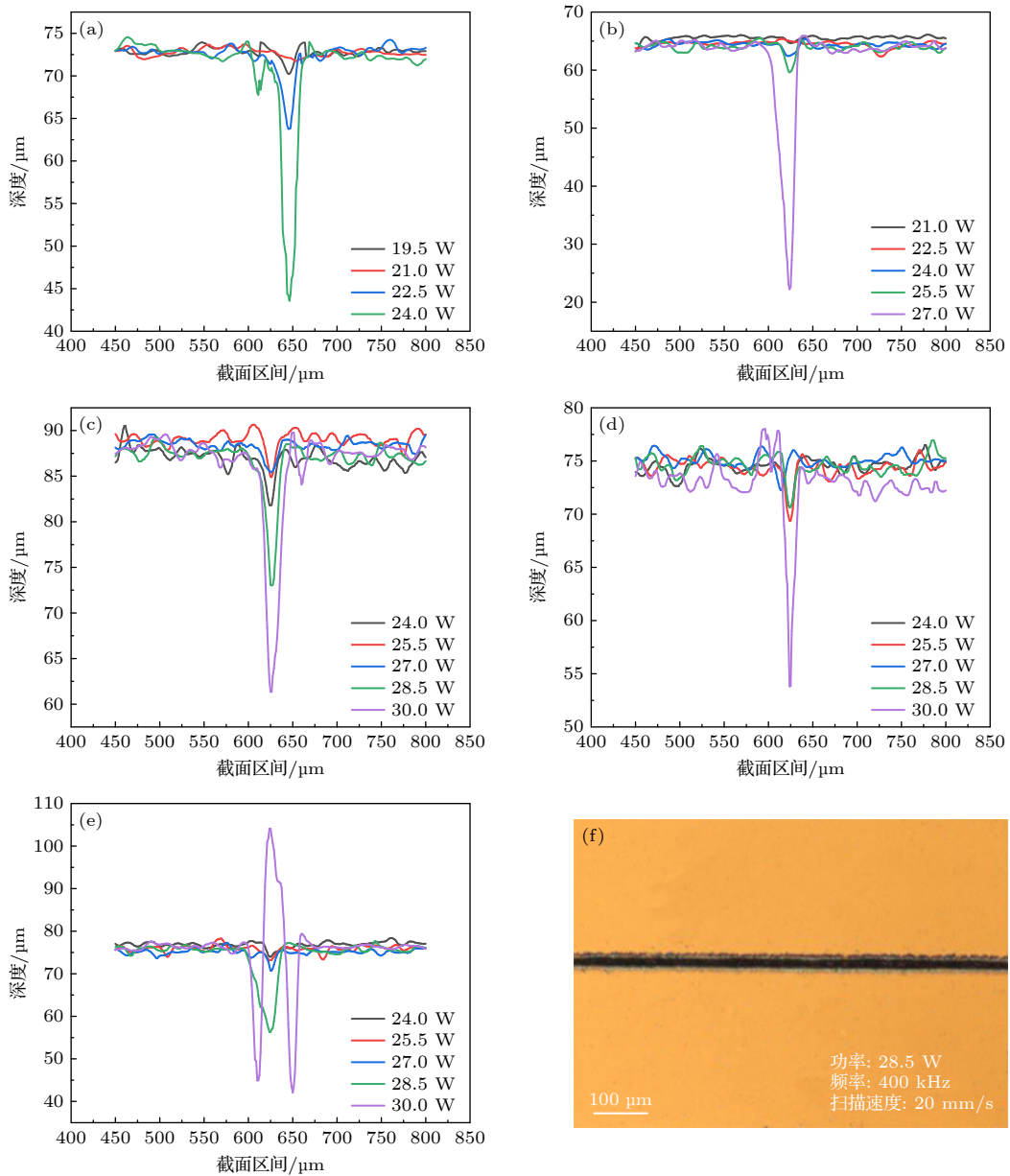


图 3 共聚焦表征 (a) 100 kHz; (b) 200 kHz; (c) 300 kHz; (d) 400 kHz; (e) 500 kHz 等重复频率下不同激光功率刻蚀的微沟槽深度; (f) 刻蚀微沟槽显微镜图像

Fig. 3. Confocal characterization (a) 100 kHz; (b) 200 kHz; (c) 300 kHz; (d) 400 kHz; (e) 500 kHz, etc repetition frequencies, etching micro groove depth with different laser power; (f) Microscopic images of etched grooves.

导的深度和宽度越小, 光传输过程中消逝场中能量越大, 因此, 较小的深度和宽度将利于全反射荧光成像. 通过激光扫描共聚焦显微镜对所制备沟槽进行了形貌表征, 此时波导的平均深度和平均宽度为 $8\ \mu\text{m}$ 和 $26\ \mu\text{m}$, 样品形貌表征和光学表征也证明了该参数下的刻蚀微沟槽很好的满足了需求, 所刻蚀微沟槽整体完整, 深度约为 $7\text{--}8\ \mu\text{m}$, 底部光滑.

3.2 波导的通光表征和荧光表征

基于上述的优化工艺参数组合, 制备出玻璃表面微沟槽并旋涂 SU-8 光刻胶. SU-8 光刻胶略高于玻璃基底的折射率使得光能够很好的被限制在波导中, 由此实现了波导的制备. 综上, 通过设计激光扫描路径制备了如图 4(a) 所示的一分三光分束器, 采用精密六轴调整架将激光耦合到波导中, 激光沿着微米级的波导回路被传播, 整体路径完整, 展现了波导和光分束器的均匀性, 如图 4(b) 所示, 从而证明了在玻璃表面通过皮秒激光刻蚀微沟槽并旋涂聚合物 SU-8 制备波导方法的可行性.

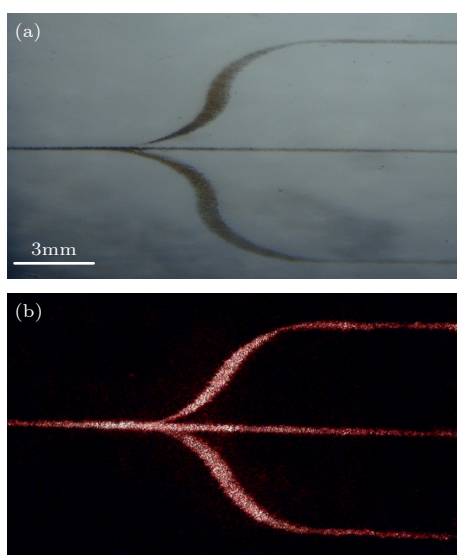


图 4 (a) 分束器显微镜图像; (b) 分束器通光表征
Fig. 4. (a) Beam splitter microscope image; (b) beam splitter clear characterization.

当光在波导内形成全内反射进行传播时, 在波导芯和波导包层的界面处会产生一层消逝场. 消逝场的光强会在极短的时间内指数级扩散衰减, 全内反射荧光 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF) 显微技术就利用消逝场, 来照明样品, 从而致使在百纳米级厚的光学薄层内的荧光团受到激发, 实现了信噪比很高的荧光成像. 在我

们的方法中, 利用了聚合物波导中的光全反射, 设计了如下实验验证了该波导的工作机制.

荧光成像实验是在自主搭建的光纤耦合观测平台上进行的, 所使用的是物镜为可调式辅助物镜, NA 为 0.25 配合同轴镜头和光源, 探测器为高清 1080 P HDMI 高速 CCD, 如图 5 所示, 首先将 RhB 溶液滴在样品表面, 溶液蒸干后会在表面留下极薄的一层 RhB 染料层 (作为荧光激发的工作物质), 然后将 $530\ \text{nm}$ 的激光耦合输入波导中, 在分束器输入端图 5(b) 和输出端图 5(c) 路径上均观察到染料分子发出的红色荧光. 以上实验证明了本文方法所制备的波导可以很好的实现基于消逝场的荧光成像, 另外结合图 4 结果, 该波导能够较好地实现 $630\ \text{nm}$ 和 $530\ \text{nm}$ 波长的激光传输, 表明该聚合物基波导具备多波长工作能力, 具有低选择性和高适配性.

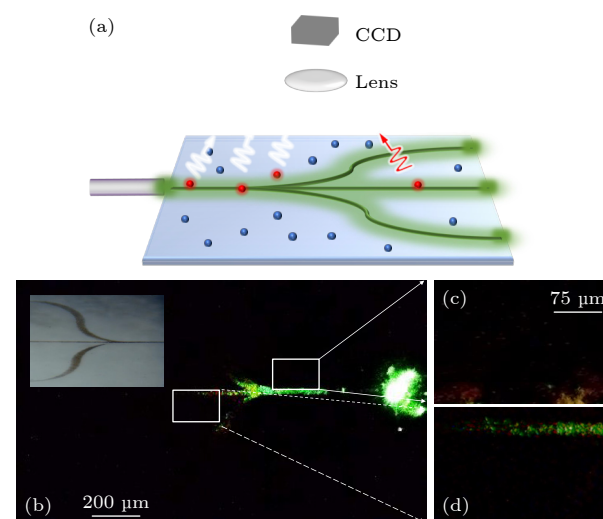


图 5 (a) 波导荧光探测示意图; (b) 平面波导的荧光表征图和实物图; (c) 输入路径局部放大图; (d) 输出路径局部放大图

Fig. 5. (a) Schematic diagram of waveguide fluorescence detection; (b) fluorescence characterization and physical diagram of a planar waveguide; (c) input path local magnification; (d) output path local magnification.

得益于激光直写无掩模的独特优势, 波导芯片可以根据实际需要实现灵活定制. 图 6(a) 展示了在一块玻璃基底上的集成了不同类型波导, 包括基础的直线型波导、单线蜿蜒型波导及合分束器. 图 6(a) 是相机 (大恒 MER-503-36 U3 M-L) 拍摄的整体形貌图, 能清晰地看到在玻璃基底上密集排列的波导形貌, 该波导先激光刻蚀一步直写加工微沟槽, 然后旋涂 SU-8 光刻胶制备而成. 图 6(b) 和 (c) 是

波导的局部放大图像, 所制备的波导形貌完整、轮廓清晰. 以上结果证明了在玻璃基底表面激光刻蚀一步直写制备微沟槽, 再旋涂 SU-8 光刻胶形成聚合物波导的方法具有加工工艺简单, 成本低廉, 设计灵活等优势.

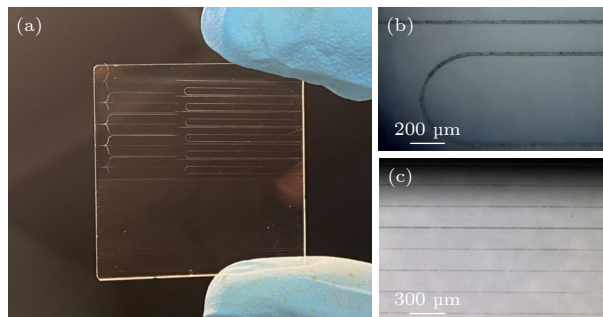


图 6 (a) 聚合物波导的集成制备图像; (b) 蜿蜒型波导; (c) 直线型波导

Fig. 6. (a) Integrated fabrication image of polymer waveguide; (b) Serpentine waveguide; (c) Linear waveguide.

4 结 论

本文提出了采用激光直写制备玻璃基平面波导型显微装置, 即利用红外皮秒刻蚀制备微沟槽, 再旋涂 SU-8 填覆微沟槽形成波导. 该装置利用平面波导实现了大尺度空间的激发照明场, 利用消逝场 (仅穿透细胞内 60—250 nm) 实现了 Z 方向高分辨率; 通过调整红外皮秒激光的加工参数 (功率, 频率), 探索了可用于波导的深度、宽度、粗糙度合适的微沟槽的加工条件; 选定合适参数后, 通过多种光学表征手段证明了激光直写制备玻璃基平面波导型显微装置的可行性; 最后, 通过大面型集成波导芯片证明了该方法的灵便性. 该方法简化了波导型荧光显微装置工艺流程, 极大地降低了加工成本, 相信相关结果将为合理设计具有理想性能的显微装置提供积极的启发.

参考文献

[1] Vysniauskas A, Lopez-Duarte I, Duchemin N, Vu T T, Wu Y L, Budynina E M, Volkova Y A, Cabrera E P, Ramirez-Ornelas D E, Kuimova M K 2017 *Phys. Chem. Chem. Phys.*

19 25252
 [2] Witte S, Negrean A, Lodder J C, de Kock C P J, Silva G T, Mansvelter H D, Groot M L 2011 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 5970
 [3] Kuimova M K 2012 *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 12671
 [4] Yoon S, Kim M, Jang M, Choi Y, Choi W, Kang S, Choi W 2020 *Nat. Rev. Phys.* 2 141
 [5] Errico C, Pierre J, Pezet S, Desailly Y, Lenkei Z, Couture O, Tanter M 2015 *Nature* 527 499
 [6] Querard J, Zhang R K, Kelemen Z, Plamont M A, Xie X J, Chouket R, Roemgens I, Korepina Y, Albright S, Ipendey E, Volovitch M, Sladitschek H L, Neveu P, Gissot L, Gautier A, Faure J D, Croquette V, Le Saux T, Jullien L 2017 *Nat. Commun.* 8 2173
 [7] Wang L, Pitter M C, Somekh M G 2010 *Appl. Opt.* 49 6160
 [8] Schneckenburger H, Richter V 2021 *Photonics* 8 275
 [9] Moo E K, Abusara Z, Abu Osman N A, Pinguan-Murphy B, Herzog W 2013 *J. Biomech.* 46 2024
 [10] Nishiyama H, Suga M, Ogura T, Maruyama Y, Koizumi M, Mio K, Kitamura S, Sato C 2010 *J. Struct. Biol.* 169 438
 [11] Kyrish M, Dobbs J, Jain S, Wang X, Yu D H, Richards-Kortum R, Tkaczyk T S 2013 *J. Biomed. Opt.* 18 096003
 [12] Lanzano LHernandez I C, Castello M, Gratton E, Diaspro A, Vicidomini G 2015 *Nat. Commun.* 6 6701
 [13] Wang M C, Yu B, Zhang W, Lin D Y, Qu J L 2020 *Acta Phys. Sin.* 69 238701 (in Chinese) [王美昌, 于斌, 张伟, 林丹樱, 屈军乐 2020 物理学报 69 238701]
 [14] Chen S Y, Wang Z C, Zhang D, Wang A M, Chen L Y, Cheng H P, Wu R L 2020 *Neurosci. Bull.* 36 1182
 [15] Chatterjee K, Pratiwi F W, Wu F C M, Chen P L, Chen B C 2018 *Appl. Spectrosc.* 72 1137
 [16] Santi P A 2011 *J. Histochem. Cytochem.* 59 129
 [17] Maizel A, von Wangenheim D, Federici F, Haseloff J, Stelzer E H K 2011 *Plant J.* 68 377
 [18] Senarathna J, Yu H, Deng C, Zou A L, Issa J B, Hadjiabadi D H, Gil S, Wang Q H, Tyler B M, Thakor N V, Pathak A P 2019 *Nat. Commun.* 10 99
 [19] Sekiguchi K J, Shekhtmeyster P, Merten K, Arena A, Cook D, Hoffman E, Ngo A, Nimmerjahn A 2016 *Nat. Commun.* 7 11450
 [20] Zhou Y L, Li X 2017 *Opt. Rev.* 24 398
 [21] Glaser A K, Chen Y, Yin C B, Wei L P, Barner L A, Reder N P, Liu J T C 2018 *Sci. Rep.* 8 13878
 [22] Wu Y Q, Xu X, Wang J X, Zhang X, Shi G H 2021 *Acta Opt. Sin.* 41 2018001
 [23] Wang H L 2017 *Ph. D. Dissertation* (Jilin: Jilin University) (in Chinese) [王海龙 2017 博士学位论文 (吉林: 吉林大学)]
 [24] O'Carroll D, Lieberwirth I, Redmond G 2007 *Nat. Nanotechnol.* 2 180
 [25] Lin Y, Gao C, Gritsenko D, Zhou R, Xu J 2018 *Microfluid. Nanofluid.* 22 97
 [26] Casamenti E, Pollonghini S, Bellouard Y 2021 *Opt. Express* 29 35054
 [27] Anders K E, Stefan B, Tung-Cheng W, Ralf H, Thomas Hr, Mark S 2021 *ACS Photon.* 8 1944

Direct laser-writing of glass-based planar waveguide for fluorescence imaging^{*}

Zhang Lin-Feng¹⁾²⁾ Ding Xiao-Chuan²⁾ Hou Zhi-Shan^{1)†} Cao Yu^{1)2)‡}

1) (*Zhejiang Key Laboratory of Laser Processing Robot, College of Mechanical & Electrical Engineering, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China*)

2) (*China International Science & Technology Cooperation Base for Laser Processing Robotics, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China*)

(Received 24 October 2022; revised manuscript received 2 February 2023)

Abstract

Fluorescent microscopic imaging technology has the characteristics of strong labeling capability, high signal strength, low experimental cost, simple imaging process, and imaging from living to in vitro, which is widely used in biological analysis imaging research such as tumor cell imaging, drug distribution in vivo detection, but how to simultaneously have both a wide field of view and a high resolution is a major difficulty in the current field of fluorescence microscopic imaging. Planar silicon waveguides have been found to be able to achieve a wide range of imaging of ultra-thin samples. However, they require sputtering deposition or ion beam etching and other preparation processes. The related processes are complex and equipment required is expensive. In this work, a planar-waveguide-type fluorescence microscope device based on direct picosecond-laser-writing is designed, in which picosecond laser is used to etch the glass surface to rapidly prepare micron sized grooves, and the low-cost and batch-preparation of glass based planar waveguides is further realized by spinning SU-8 photoresist. The waveguide diameter and depth can be customized by adjusting laser processing power, frequency, scanning speed and other parameters. The microscopic detection experiment with using Rhodamine B fluorescent molecule verifies that the direct laser-writing glass based planar waveguide fully meets the requirements for biological imaging with high resolution and large field of view. This simple and rapid processing method can effectively improve the the fluorescence imaging.

Keywords: laser etching, polymer waveguide, fluorescence microscopic imaging, evanescent Field

PACS: 42.62.-b, 42.70.Ce, 42.70.Jk, 42.82.Et

DOI: 10.7498/aps.72.20222033

^{*} Project supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (Grant Nos. LZ20E050003, LD22E050001) and Wenzhou Basic Scientific Research Project (Grant No. 2022G0025).

[†] Corresponding author. E-mail: houzs21@wzu.edu.cn

[‡] Corresponding author. E-mail: yucao@wzu.edu.cn



激光直写玻璃基平面波导用于荧光成像

张林峰 丁潇川 侯智善 曹宇

Direct laser-writing of glass-based planar waveguide for fluorescence imaging

Zhang Lin-Feng Ding Xiao-Chuan Hou Zhi-Shan Cao Yu

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 72, 074203 (2023) DOI: 10.7498/aps.72.20222033

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.72.20222033>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

激光刻蚀对镀金表面二次电子发射的有效抑制

An effective reduction on secondary electron emission yield of gold coated surfaces by laser etching

物理学报. 2019, 68(6): 067901 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20181547>

结构光照明技术在二维激光诱导荧光成像去杂散光中的应用

Structured illumination for two-dimensional laser induced fluorescence imaging to eliminate stray light interference

物理学报. 2019, 68(21): 218701 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190977>

含间隔层的增益导引-折射率反导引平面波导激光器中高阶模式抑制研究

Suppression of higher order modes in gain-guided index-antiguide planar waveguide laser

物理学报. 2018, 67(10): 104204 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180138>

荧光寿命显微成像技术及其应用的最新研究进展

Recent progress of fluorescence lifetime imaging microscopy technology and its application

物理学报. 2018, 67(17): 178701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180320>

任意数量离散不规则感兴趣区域的快速荧光寿命显微成像

Fast fluorescence lifetime microscopy imaging of any number of discrete irregular regions of interest

物理学报. 2021, 70(19): 198701 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210941>

飞秒激光直写光量子逻辑门

Femtosecond laser direct writing of optical quantum logic gates

物理学报. 2019, 68(10): 104205 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190024>