

doi: 10.3788/gzxb20154404.0426004

介质微球超分辨成像薄膜

庞辉^{1,2}, 杜春雷³, 邱琪², 邓启凌¹, 张满¹, 尹韶云³

(1 中国科学院光电技术研究所, 成都 610209)

(2 电子科技大学 光电学院, 成都 610064)

(3 中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 重庆 401122)

摘 要:针对现有基于微球的超分辨成像系统中液体浸没方式的不稳定性和繁琐性, 提出采用介质层来替代液体层, 制成含有单层密排微球的薄膜. 研究折射率较低的二氧化硅微球和折射率较高的钛酸钡微球浸没在三种不同液体中时的成像特性, 设计并制备了一种由单层密排的钛酸钡微球和聚二甲基硅氧烷(PDMS)软膜构成的薄膜, 并开展了相应的超分辨成像实验. 结果表明: 当液体折射率在 1.33~1.548 之间时, 二氧化硅微球只有在半浸没时才能分辨出小于衍射极限的样品特征, 而钛酸钡微球则需要全浸没才能实现超分辨成像. 在 600 nm 中心波长的照明下, 利用该薄膜可以清晰地分辨出周期为 278 nm, 占空比为 1:1 的硅结构光栅.

关键词: 微球; 超分辨; 薄膜; 显微镜; 光学设计

中图分类号: TN216

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2015)04-0426004-6

Investigation of Microsphere Based Thin-film for Super-resolution Imaging

PANG Hui^{1,2}, DU Chun-lei³, QIU Qi², DENG Qi-ling¹, ZHANG Man¹, YIN Shao-yun³

(1 Institute of Optics and Electronics, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610209, China)

(2 School of Optoelectronic Information, University of Electronic Science and Technology, Chengdu 610064, China)

(3 Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing 401122, China)

Abstract: A thin-film was proposed for optical super-resolution imaging, which substitute the liquid layer with a soft mold in the original dielectric microsphere based super-resolution imaging. The imaging character of silica and barium titanate glass microsphere immersed in three different liquid were investigated. And a thin-film was prepared which contains a layer of closely-arranged barium titanate glass microsphere embedded in a transparent polydimethylsiloxane soft mold. The result shows that the silica microsphere can discern the sample feature below the diffraction limit only it is semi-immersed in the liquid with refractive index lies in the range 1.33~1.548. However, the barium titanate glass microsphere should be fully immersed to achieve super-resolution imaging. The experiment is also taken to verify the feasibility of the thin-film based super-resolution imaging. A grating with period of 278 nm can be clearly discerned at the illuminated wavelength of 600 nm.

Key words: Microsphere; Super resolution; Thin film; Microscope; Optical design

OCIS Codes: 260.1960; 260.2710; 180.0180; 310.6845; 070.0070

0 引言

光学显微镜在生命科学、材料科学和微纳加工等领域有着不可替代的作用. 然而由于衍射极限的存在,

传统光学显微镜的横向分辨率约为二分之一照明波长, 已经远远不能满足当代人们对微观世界进行探索的需求^[1-2]. 因此探索新的成像机理, 发展具有超分辨能力的成像系统具有重要的科学意义. 近年来, 出现了

基金项目: 国家自然科学基金(Nos. 11174281, 61275061)资助

第一作者: 庞辉(1986-), 男, 博士研究生, 主要研究方向为光学超分辨成像及衍射光学. Email: wuli041@126.com

导师(通讯作者): 杜春雷(1962-), 女, 研究员, 博导, 主要研究方向为光学与微光学及应用. Email: cldu@cigit.ac.cn

收稿日期: 2014-10-31; 录用日期: 2014-12-12

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

各种各样的超分辨成像方法,如:基于负折射率材料的超透镜^[3-4],荧光显微^[5],结构光照明显微^[6-7]和合成孔径显微^[8]等等.然而由于它们复杂的结构或者实验装置或者技术制约,在一定程度上限制了它们的使用范围.

2011年,英国曼彻斯特大学的王增波小组通过在待观测样品表面涂敷直径为 $4.74\ \mu\text{m}$ 的二氧化硅微球,再结合传统的光学显微镜进行观察,在白光照明下,分辨出了直径 $50\ \text{nm}$ 的多孔氧化铝,获得了 $1/14$ 波长的横向分辨率^[9].相比于已有的远场超分辨成像技术这种方法显得尤为简单,同时分辨率高,利于对样品进行实时动态地观察,因而引起了人们的广泛关注^[10-12].

随后,科研人员发现将二氧化硅微球半浸没在酒精中可以显著地提高成像对比度^[13].之后,Arash指出折射率较高的钛酸钡微球完全浸没在异丙醇中也可以实现超分辨成像^[14].但是由于液体的挥发性和不稳定性,不利于对样品进行长时间地观察.同时每次滴的液体,其厚度和形状都会大大影响成像的放大率和分辨率.

为了克服液体浸没方式的不足,本文提出用透明介质层来替换原有的液体层,制备出一种具有超分辨成像能力的薄膜.每次观察样品时,只需要将薄膜直接覆盖在样品表面,再在显微镜下观察即可实现超分辨成像.

1 超分辨成像原理

图1为本文提出的基于薄膜的超分辨成像系统示意图.由一层紧密排列的微球和透明介质层组成的薄膜直接覆盖在待测样品表面,再结合传统的光学显微镜进行观察,便可以实现超分辨成像.根据麦克斯韦方程组,电场的切向分量在边界处连续,因而携带物体精细结构信息的部分倏逝波能够通过微球边界耦合进微球形成传播波,进而能够传播到远场参与成像^[15].由于倏逝波转换成了传播波,根据傅里叶光学原理,频谱压缩对应着物体的放大.因此,该薄膜结构能够对样品进行初次地放大.当放大后样品的特征尺寸大于光学显微镜的横向分辨率时,便可以清晰地分辨出样品的细节.由于倏逝波在传播方向上指数衰减,因此将微球放置于薄膜的底端,使得微球贴着或者非常靠近样品表面,这样有利于更多的倏逝波分量耦合进微球.

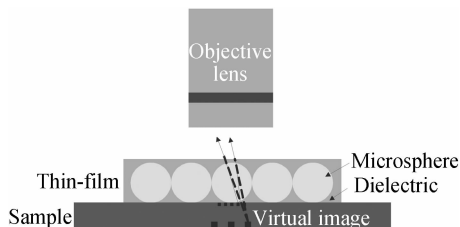


图1 基于薄膜的超分辨成像系统

Fig. 1 The schematic diagram of the thin-film based optical super-resolution imaging

2 薄膜参数分析

为了确定成像薄膜的相关参数.采用 SiO_2 微球($n=1.46$)和 BaTiO_3 微球($n=2.0$),并选择水($n=1.33$),酒精($n=1.38$)和折射率匹配液($n=1.548$)作为介质层,对周期为 $278\ \text{nm}$,占空比为 $1:1$ 的硅结构光栅进行超分辨成像实验.由此分析微球的折射率和直径以及透明介质层的折射率和厚度对超分辨成像的影响.实验中采用Olympus BX51M型号的反射式光学显微镜,配备中心波长为 $600\ \text{nm}$ 的汞灯照明,后续采用CCD进行图像采集和测量.

首先选定介质层折射率为 $n=1.548$,比较 SiO_2 微球和 BaTiO_3 微球的成像特性,实验结果如图2.图2(a)为待测光栅样品的扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)图.图2(b)为不放置微球时,直接利用 $100\times$ ($\text{NA}=0.9$)显微镜观察样品的结果.根据瑞利判据,光学显微镜的横向分辨率约为 $d=0.61\lambda/\text{NA}=407\ \text{nm}$,因而无法分辨出周期为 $278\ \text{nm}$ 的光栅.图2(c)为在样品表面涂敷直径 $5\ \mu\text{m}$ 的 SiO_2 微球再在显微镜下观察的结果.与文献[9]中不浸没的 SiO_2 微球能达到 $50\ \text{nm}$ 分辨率的结果不同,本实验中不浸没的微球始终无法清晰分辨出周期 $278\ \text{nm}$ 的光栅,其主要原因在于本文待测样品为硅而不是金属^[9].图2(e)、(g)分别为将 SiO_2 微球部分浸没和全浸没在 $n=1.548$ 的折射率匹配液中的成像结果,表明只有当微球部分浸没在液体中或者说液体层比较浅的时候,才能分辨出光栅条纹.且越靠近微球中心的条纹越清晰,越靠近微球边缘的条纹枕形畸变越严重.图2(d)、(f)、(h)分别为直径 $20\ \mu\text{m}$ 的 BaTiO_3 微球不浸没、部分浸没和全浸没在折射率为 1.548 的折射率匹配液中的成像结果.不同于 SiO_2 微球, BaTiO_3 微球只有在全浸没时才能分辨出样品的光栅结构.因此对于本文提出的成像薄膜来说,只能选择折射率较大的 BaTiO_3 微球,从而介质层的厚度可以大于微球直径,以便于制成柔性的并方便转移的薄膜.

其次,选定 BaTiO_3 微球和 SiO_2 微球,分析介质层的折射率 n 对成像的影响.实验中选择 $n=1.33$ 、 $n=1.38$ 、 $n=1.548$ 三种折射率,并开展了相应的成像实验.获得了与图2一致的结果,即 SiO_2 微球只有在半浸没下才能观察到光栅条纹,而 BaTiO_3 微球只有在全浸没下才能观察到条纹.最终测量得到的成像放大率如表1.

表1 实验测量得到的成像放大率

Table 1 Experimentally determined magnification			
	$n=1.33$	$n=1.38$	$n=1.548$
SiO_2 sphere	$1.8\times$	$1.67\times$	$1.44\times$
BaTiO_3 sphere	$3.96\times$	$2.88\times$	$2.11\times$

从表 1 可以看出:当介质层的折射率从 1.548 减小到 1.33 时, SiO₂ 微球的成像放大率从 1.44× 增大到 1.8×, 而 BaTiO₃ 微球的成像放大率则从 2.11× 增大到 3.96×. 即当微球一定时, 适当减小介质层的折射率会得到较大的成像放大率; 而当周围媒介折射率一定

时, 增加微球折射率可以提高成像放大率. 对于本文提出的超分辨成像薄膜而言, 其主要功能是将小于衍射极限的样品特征, 进行初步放大. 而只有当放大后样品的特征尺寸大于显微镜的横向分辨率时, 才能被分辨. 所以较大的成像放大率将有利于观察更小的物体.

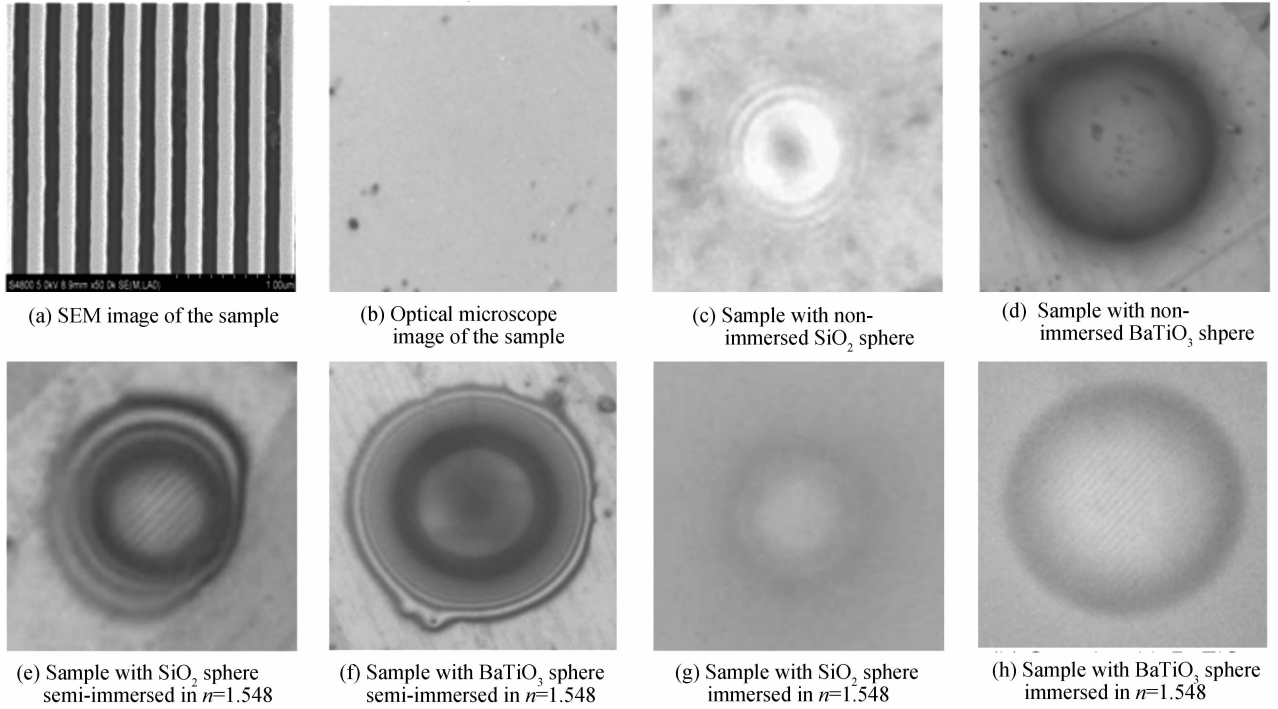


图 2 基于微球的成像实验结果
Fig. 2 The experimental results

根据几何光学的光线追迹原理, 当物体紧贴球放置时, 成像放大率约为 $M=n/(2-n)$, 其中 n 是微球与媒介的相对折射率, 与球直径无关^[16]. 而实验中测量发现不同直径的微球具有不同的放大率. 图 3 为测量得到的直径在 15 μm 到 70 μm 之间的 BaTiO₃ 微球全浸没在酒精中所对应的成像放大率. 从图中可以看出: 当微球直径从 15 μm 增加到 25 μm 时, 放大率近似线性地从 3.5× 增加到 4×. 随着直径的进一步增加, 放大率逐渐减小. 严格的电磁仿真发现当微球的尺寸较小时, 在微球的菲涅尔衍射区内光线传播的路径是

弯曲的^[17], 因而基于光线直线传播原理的几何光学无法准确预测成像放大率. 而当微球尺寸足够大时, 几何光学理论将变得适用, 因而放大率也会最终趋于几何光学所预测的值 $M=n/(2-n)=2.63\times$.

FDTD-solution 商用软件是采用时域有限差分算法来求解麦克斯韦方程组, 可以较为准确地仿真电磁场与物质的相互作用. 借助 FDTD-solution, 研究介质层对微球超分辨成像的影响机制, 仿真模型如图 4. 仿真区域设置为 16 μm×8 μm, 网格取 10 nm×10 nm, x 和 y 方向上的边界条件都为吸收边界. 为了便于观察, 选择两个宽度 100 nm, 中心间隔 300 nm 的双缝作为

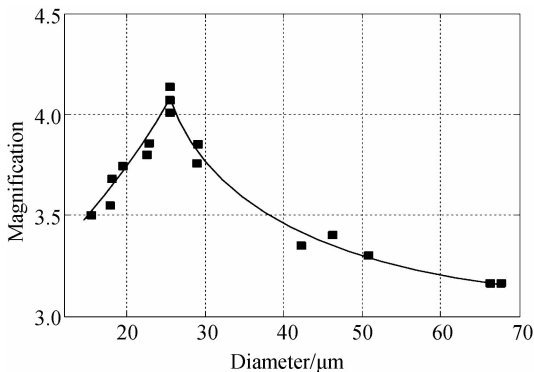


图 3 放大率与直径的关系
Fig. 3 Magnification vs diameter

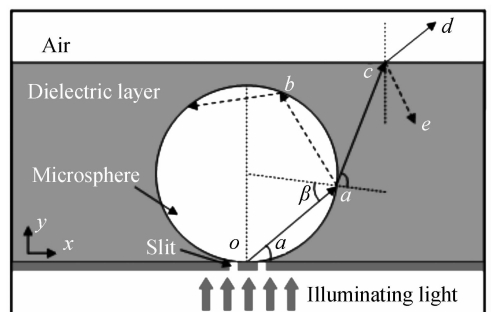


图 4 仿真模型
Fig. 4 Simulated structure with FDTD method

物体,照明光为波长 600 nm 的平面光,直径 5 μm 的 BaTiO₃ 微球作为成像透镜,介质层厚度为 6 μm ,折射率为 n_L .

根据傅里叶光学的原理,空域中的光场分布对应频域中特定的频谱. Abbe 指出,要想分辨出某个方向上特征尺寸为 d 的物体细节,至少需要捕获这个方向上波数在 $(-\lambda/d, \lambda/d)k_0$ 范围内的频谱,其中 λ 为照明波长, k_0 为自由空间中的波数. 采用 Matlab 软件计算得到的双缝物体的频谱如图 5. 因此必须能在远场探测到 $(-2k_0, 2k_0)$ 内的频谱才能恢复出双缝物体. 自由空间中只有 $(-k_0, k_0)$ 这部分频谱对应着传播波并能进行远场传播,而 $(-2k_0, -k_0)$ 和 $(k_0, 2k_0)$ 频谱对应着倏逝波,在传播方向上指数衰减. 因而超分辨成像的本质便是如何将近场携带物体精细结构信息的倏逝波转换成可以远场传播的传播波.

当微球放置于样品表面时,由于电场的切向分量在边界处是连续的,加上微球的折射率高于自由空间的折射率,原本 $(k_0, 2k_0)$ 部分的倏逝波能够通过微球边界耦合进微球形成传播波^[15]. 考虑到双缝位于微球接触点附近, x 方向的波数和角度 α 的对应关系为

$$\cos \alpha = \frac{k_x}{nk_0}, -nk_0 \leq k_x \leq nk_0 \quad (1)$$

式中 n 为微球的折射率. 波数越大对应的角度 α 越小,从而在微球/介质层界面处的入射角 β 越大,当介质层厚度较小或者折射率较低时,由于边界处较大的折射率差,并且光是从光密到光疏,所以全反射临界角很小,部分物体的高频信息会因为全反射而被束缚在球内,如图 4 中的 σ - a - b 路径. 当介质层厚度或者折射率增加时,全反射临界角增加,更多的高频信息能够透过微球,如图 4 中的 σ - a - c 路径. 同时由于介质层和空气层界面的存在,较大的介质层折射率会使得光在介质层/空气界面处发生全反射,如图 4 中的 σ - a - e 路径. 因此,介质层的折射率选取必须适中.

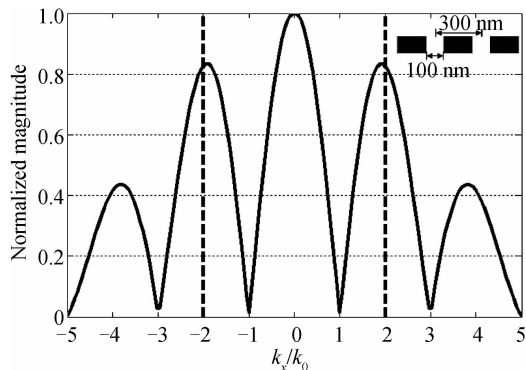


图 5 双缝物体的频谱

Fig. 5 The calculated spectrum of the two slits

借助 FDTD-solution 仿真得到的不同介质层折射率 n_L 下的电场强度分布如图 6. 图 6(a) 为 $n_L=1$ 时的

电场强度分布,即 BaTiO₃ 球不浸没于任何介质层中的情况. 此时由于微球/空气界面处较大的折射率差,携带物体精细结构信息的倏逝波信息由于界面处的全反射,被束缚在球内,形成回音壁模式的震荡. 当 n_L 增加到 1.33 时,高频成分可以有效地通过微球边界耦合到远场,随着 n_L 的进一步增加,从介质层/空气界面出射的高频成分的角度越大,对应着整体频谱的展宽,因而成像放大率会减小. 当 n_L 增加到 1.8 时,由于介质层和空气处界面的全反射,这部分高频成分不能被远场探测. 综上所述,对于 BaTiO₃ 微球而言,介质层的折射率应在 1.3-1.7 之间,从而使得物体的部分高频信息能够通过微球耦合成远场的传播波.

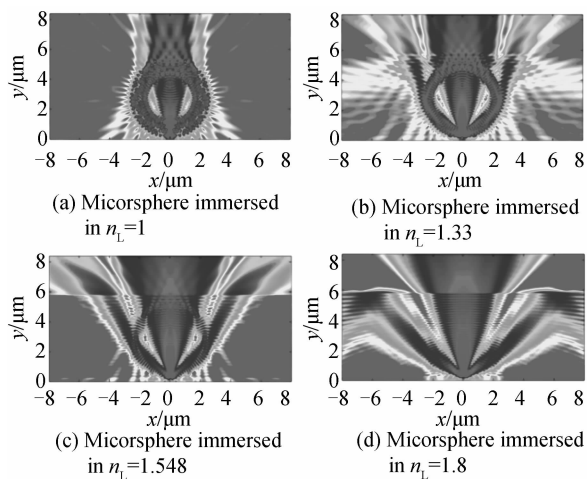


图 6 FDTD 仿真结果

Fig. 6 The simulated result with FDTD method

3 薄膜制备

通过上述分析,选用折射率较高的直径在 30 μm 到 100 μm 之间的 BaTiO₃ 微球,并选择折射率为 1.4 的聚二甲硅氧烷(PDMS)作为透明介质层. PDMS 是由基底液(Sylgard 184 silicone elastomer)和固化剂(Sylgard 184 curing agent)按 10:1 的比例混合,并经过热固化后所形成的一种柔性材料. 杨氏模量和表面能都较低,因而具有较好的弹性且易脱模. 在固化前呈液体状态,可以通过旋涂工艺有效地控制其厚度.

整个薄膜的制备流程如图 7. 首先是基片处理. 将表面光洁的直径 20 mm 的石英基片放置在浓度为 98% 的浓硫酸和双氧水以质量比 3:1 配制成的溶液中,80 $^{\circ}\text{C}$ 的水域加热一小时,以去除基片表面的杂质;取出基片用去离子水反复冲洗,并在去离子水中超声振荡 3~5 min,以去除基片表面的酸性清洗液;将基片放置于氨水、双氧水和去离子水以质量比 1:1:5 配制成的溶液中,超声振荡 1 h,然后取出基片用去离子水反复冲洗 2~3 次,并在去离子水中超声振荡 3~5 min,使得处理后的基片表面具有亲水性.

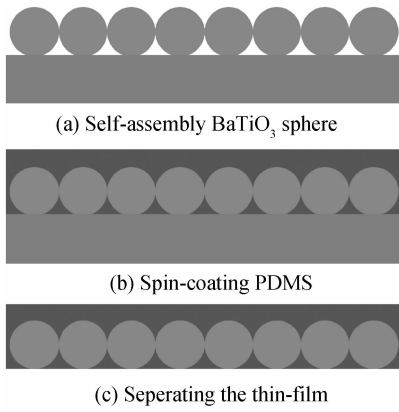


图 7 薄膜的制备流程

Fig. 7 Flow chart of the thin film preparation

其次是微球自组装. 将处理好的石英基片以 10° 的角度倾斜放置, 将 $BaTiO_3$ 微球粉末溶解于去离子水中, 再用吸管吸取一部分滴在基片一端, 由于使用的 $BaTiO_3$ 微球直径较大加上本身密度较大, 随着水分的蒸发并在微球自身重力作用下基片表面会形成密排单层的微球. 接着在微球表面涂敷一层 PDMS, 通过调节甩胶机转速控制其膜厚为 $1\text{ }\mu\text{m}$, 再放入 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 的烤箱中固化两小时. 最后将固化后的 PDMS 从基片上剥离, 形成带有单层 $BaTiO_3$ 微球的薄膜. 需要注意的是 PDMS 厚度不能太厚, 使显微物镜和待测样品间留有足够的可调空间. 同时也不能太薄, 以便于能从石英基片上完整剥离.

4 实验和结果

对制备出的薄膜进行超分辨成像实验. 图 8(a) 为制备出的成像薄膜, 由于采用了 PDMS 作为介质层, 所以整个薄膜是柔性的. 图 8(b) 为采用 $50\times$ 的显微物镜观察得到的薄膜局部结构图, 可以看出微球是紧密排列的. 由于选用的微球不是单一直径, 所以微球间的间隔不尽相同. 将薄膜直接放置于周期为 278 nm 的硅结构光栅表面上, 再结合显微镜进行观察, 结果如图 8(c). 图 8(d) 为图(c)中矩形区域的放大图, 从中可以清晰地分辨出样品的光栅条纹.

最后需要说明的是, 在图 2(h) 中条纹最清晰的位置位于微球的中心区域, 而图 8(d) 中则是边缘区域成像最清晰. 这最主要的原因在于图 2(h) 中的 $BaTiO_3$ 微球直径为 $20\text{ }\mu\text{m}$, 而图 8(d) 的微球直径为 $65\text{ }\mu\text{m}$. 在第一节超分辨成像原理中已经指出, 微球具有高分辨的本质原因在于携带物体精细结构信息的部分倏逝波能够通过微球边界耦合进微球形成传播波. 当微球直径较小时, 微球与接触点附近微球边界的曲率较大, 更容易耦合倏逝波. 随着微球直径的增加, 接触点附近的微球边界可近似看作是平行于样品表面的, 从而倏逝波的耦合能力减弱, 以至于成像最清晰的位置偏离中

心区域.

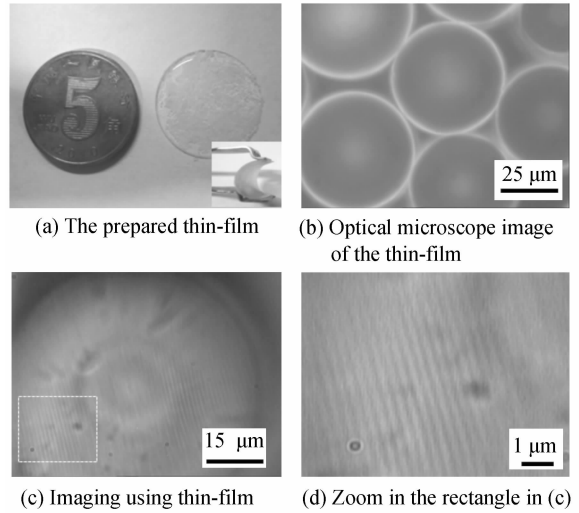


图 8 基于薄膜的成像实验结果

Fig. 8 The imaging result with our prepared thin-film

5 结论

本文提出并制备了一种由紧密排列的单层 $BaTiO_3$ 微球和 PDMS 软膜构成的薄膜, 只需要将该薄膜直接放置于待测样品表面, 再结合传统的光学显微镜进行观察, 便可以实现超分辨成像. 因此与传统的光学显微镜有很好的兼容性. 与其它超分辨成像方法相比, 不需要精密的对准与移动装置和扫描控制装置, 操作简单, 使用方便, 所成的像可通过人眼进行实时地直接观测, 在生命科学与医学、材料科学和微纳加工等研究领域有着非常广阔的应用前景.

参考文献

- [1] YAO Bao-li, LEI Ming, XUE Bin, *et al.* Progress and applications of high-resolution and super-resolution optical imaging in space and biology[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(11):1607-1618.
姚保利, 雷铭, 薛彬, 等. 高分辨和超分辨光学成像技术在空间和生物中的应用[J]. *光子学报*, 2011, **40**(11):1607-1618.
- [2] WANG wei. Superresolution technology of Gaussian beam under high numerical aperture [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2013, **42**(4):441-446.
王伟. 高数值孔径下高斯光束超分辨技术[J]. *光子学报*, 2013, **42**(4):441-446.
- [3] LIU Zhao-wei, DURANT S, LEE H S, *et al.* Far-field optical superlens[J]. *Nano Letter*, 2007, **7**(2):403-408.
- [4] LIU Zhao-wei, LEE H S, XIONG Y, *et al.* Far-field optical hyperlens magnifying sub-diffraction-limited objects [J]. *Science*, 2007, **315**(5819):1686.
- [5] SUAREZ M F, TING A Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells[J]. *Nature Reviews*, 2008, **9**:929-943.
- [6] GUSTAFSSON M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2000, **198**(P2):82-87.
- [7] HIRVONEN L M, WICKER K, MANDULA O, *et al.* Structured illumination microscopy of a living cell [J]. *European Biophysics Journal: EBJ*, 2009, **38**(6):807-812.

- [8] NEUMANN A, KUZNETSOVA Y, BRUECK S R J. Optical resolution below $\lambda/4$ using synthetic aperture microscopy and evanescent-wave illumination [J]. *Optics Express*, 2008, **16**(25):20477-20483.
- [9] WANG Zeng-bo, GUO Wei, LI Lin, *et al.* Optical virtual imaging at 50nm lateral resolution with a white-light nanoscope [J]. *Nature Communications*, 2011, **2**:218.
- [10] YE Ran, YE Yong-hong, MA Hui-feng, *et al.* Experimental far-field imaging properties of a $\sim 5 \mu\text{m}$ diameter spherical lens[J]. *Optics Letters*, 2013, **38**(11):1829-1831.
- [11] LI Lin, GUO Wei, YAN Yin-zhou, *et al.* Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy[J]. *Light: Science & Applications*, 2013, **2**:104.
- [12] WANG Shu-ying, ZHANG Hai-jun, ZHANG Dong-xian. Location free optical microscopic imaging method with high-resolution based on microsphere superlenses[J]. *Acta Physica Sinica*, 2013, **62**(3):034207.
王淑莹, 章海军, 张冬仙. 基于微球透镜的任选区高分辨光学显微成像新方法研究[J]. 物理学报, 2013, **62**(3):034207.
- [13] HAO Xiang, KUANG Cui-fang, LIU Xu, *et al.* Microsphere based microscope with optical super-resolution capability[J]. *Applied Physics Letters*, 2011, **99**(20):203102.
- [14] DARAFSHEH A, WALSH G F, NEGRO L D, *et al.* Optical super-resolution by high-index liquid-immersed microspheres [J]. *Applied Physics Letters*, 2012, **101**(14):141128.
- [15] ARYEH Y B. Superresolution observed from evanescent waves transmitted through nano-corrugated metallic film[J]. *Applied Physics B*, 2012, **109**:165-170.
- [16] LIU Shuai, YE Ran, CAO Lin-lin. Fabrication of removable superlens and research of its characteristics [J]. *Journal of Applied Optics*, 2014, **35**(3):427-431.
刘帅, 叶燃, 曹玲玲. 一种可移动超分辨成像系统的制备及其性质研究[J]. 应用光学, 2014, **35**(3):427-431.
- [17] LEE J Y, HONG B H, KIM W Y, *et al.* Near-field focusing and magnification through self-assembled nanoscale spherical lenses[J]. *Nature*, 2009, **460**:498-501.