

# 微球尺寸对其超分辨成像性质的影响

曹玲玲,姚 岭,任 杰,叶永红

(南京师范大学物理科学与技术学院,江苏 南京 210023)

[摘要] 采用自组合法制备了二维六角密排的胶体晶体样品. 使用直径为  $1.97\ \mu\text{m}$ 、 $3.35\ \mu\text{m}$ 、 $4.87\ \mu\text{m}$ 、 $7.27\ \mu\text{m}$  的二氧化硅微球,对上述胶体晶体样品进行了微球成像实验,观察到微球对样品具有放大作用. 用酒精半浸没微球时,通过微球观察到样品的对比度显著提高. 研究结果表明:小尺寸的微球更利于接受高频信息;微球在酒精半浸没的情况下能接受更多高频信息,因此显著提高像的对比度;且不同频率成份参与成像,微球对这些成份的放大率是不同的.

[关键词] 微球,透镜,成像

[中图分类号] O439 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2014)03-0048-06

## Optical Super-Resolution Imaging Properties of Microscale Spherical Lenses with Different Sizes

Cao Lingling, Yao Ling, Ren Jie, Ye Yonghong

(School of Physics and Technology, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Two-dimensional hexagonal close-packed colloidal crystal samples are prepared by a self-assembly method. The image properties of silica microscale spherical lenses of different diameters  $1.97\ \mu\text{m}$ ,  $3.35\ \mu\text{m}$ ,  $4.87\ \mu\text{m}$  and  $7.27\ \mu\text{m}$  are studied. We found that the microscale lens can magnify the colloidal crystal samples and the image contrast is greatly improved when the microscale lenses are semi-immersed in ethanol. Our experimental results indicate that small size lenses can receive more high-frequency Fourier components of the object and the semi-immersed microscale lenses can also efficiently intercept more high frequency components. Moreover, the magnification of the microscale lenses is different for different Fourier components of the object.

**Key words:** microspheres, microscale lenses, imaging

受到阿贝衍射极限的限制,理论上传统光学显微镜可以分辨物体的最小尺寸约  $200\ \text{nm}$ ,实际上通过传统光学显微镜观察到  $300\ \text{nm}$  的物体都很困难,因此突破衍射极限成为当今光学领域十分热门的课题之一<sup>[1-10]</sup>. 目前可以通过扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)、近场光学显微镜(SNOM)等观察到尺寸在衍射极限以下的物体. 然而 SEM 和 TEM 需要在真空环境下观察,而且做 SEM 测量时,不导电的样品需要喷金,TEM 则需要把样品做成很薄的片状,不利于观察活体. AFM 和 SNOM 无法实时、直接观察物体. 因此这些方法都不够方便. 近期微米、纳米尺寸的介质球(微球)透镜的研究为我们提供了一种简单、实时、直接的获得超分辨成像的方法. Fletcher 等人用固体浸没微透镜观察到近场成像<sup>[11]</sup>. Lee 等人通过半球形的微球透镜观察到条纹间距为  $250\ \text{nm}$  样品的近场聚焦和放大现象<sup>[12]</sup>. Wang 等人证实在蓝光光碟表面放置一透明微球,微球就可以收集消逝波,从而可以在远场清晰地观察到蓝光光碟表面的条纹<sup>[13]</sup>. Hao 等人研究表明,用酒精半浸没微球透镜,微球的成像放大率会变小,但可以改善成像的对比度<sup>[14,15]</sup>. 王淑莹等人认为二氧化硅微球的放大率约为  $2.7\times$ ,放大率只与材料有关,而与微球的半径无关<sup>[16]</sup>. 最近 Li 报道了将微球透镜及光学镜头一起浸没在液体中,可以直接观察到直径  $75\ \text{nm}$  的腺病毒<sup>[17]</sup>. 近期我们研究发现,直径为  $4.87\ \mu\text{m}$  的微球通过滴酒精半浸没,当光碟表面和微球相距  $12$

收稿日期:2014-03-18.

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20133207110007).

通讯联系人:叶永红,博士,教授,研究方向:纳米光学、透镜成像、光子晶体等. E-mail: yeyonghong@njnu.edu.cn

$\mu\text{m}$  时,通过微球还可以清楚地观察蓝光光碟表面的条纹<sup>[18]</sup>. 目前关于微球成像的机理研究比较少,Chen 等人认为微球能超分辨成像是由于微球的‘photonic nanojets’效应引起的<sup>[19]</sup>. Hao 等人认为是因为局限在近场的光线在粗糙的样品表面发生散射然后耦合进入微球并传播<sup>[14,15]</sup>. 本文研究了不同尺寸的微球在直接观察和酒精半浸没微球时观察尺寸小于衍射极限和大于衍射极限物体时的成像性质. 结果表明小尺寸微球能够收集到更多的高频信息;在酒精半浸没微球时,微球接收到的高频信息更多;不同频率成份参与成像,微球对不同频率成份的放大率也不一样.

## 1 实验

实验中使用的超分辨成像系统如图 1 所示,其中所用的显微镜是 Leica 反射式显微镜(DM2500 M),发出光的中心波长是 540 nm. 实验中采用 100 $\times$ , NA=0.9 的显微镜物镜观察样品. 显微镜配备有一个 CCD 照相机. 实验分为 4 步. 第一步,利用聚苯乙烯(PS)小球制备胶体晶体. 将洗净的载玻片垂直放入 PS 小球溶液和去离子水的混合溶液中,随着溶剂的蒸发,小球在载玻片表面的毛细张力作用下流动、聚集,最终形成胶体晶体. 用此方法制备了样品 A、B,分别是直径 280 nm、415 nm 的 PS 小球. 第二步,利用热蒸发的方法在样品 A、B 上沉积厚度为 20 nm 的金属银膜. 第三步,在沉积了银膜的样品 A、B 的表面滴上直径分别为 1.97  $\mu\text{m}$ 、3.35  $\mu\text{m}$ 、4.87  $\mu\text{m}$  和 7.27  $\mu\text{m}$  的微球溶液并烘干(微球的材质为二氧化硅, bangs lab). 最后,将制备好的样品放在显微镜下通过微球对胶体晶体样品进行观测. 实验中用两种方法来观察样品,一种是在显微镜下直接通过微球观测样品;另一种是在微球上滴酒精,使微球半浸没于酒精,通过半浸没于酒精的微球来观测样品. 实验中第一步所制备的样品形貌采用扫描电子显微镜(FESEM, Hitachi JSM-7600F)观测,图 2(a)、2(b)分别是样品 A、B 的扫描电镜图,可知样品 A、B 中的 PS 小球基本呈密六方排列.

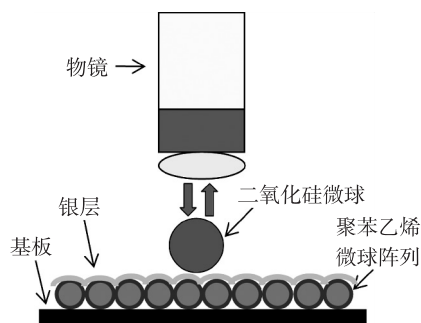
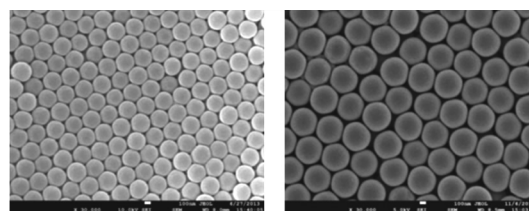


图 1 实验成像系统

Fig. 1 Schematic of the experimental setup



(a)样品A

(b)样品B

图 2 扫描电镜图

Fig. 2 SEM images of sample A and B

## 2 结果与讨论

在样品 A 和 B 上滴不同尺寸二氧化硅微球,在显微镜下通过微球观察样品的结果分别如图 3、4 所示. 在图 3 中,样品 A 的 PS 小球尺寸是 280 nm,用显微镜直接观察时,没有滴微球的区域分辨不出 A 样品的 PS 小球. 在样品 A 有微球的区域上,在显微镜下通过 1.97  $\mu\text{m}$  的微球对样品进行观察,能够分辨出微球下面的 PS 小球,通过 3.35  $\mu\text{m}$  的微球可隐约看到下面的 PS 小球,而通过观察 4.87  $\mu\text{m}$  和 7.27  $\mu\text{m}$  的微球时分辨不出它们下面的 PS 小球. 样品 A 的 PS 小球尺寸是 280 nm,该尺寸接近分辨极限<sup>[12]</sup>,观察到的像属于超分辨成像. 我们也在样品 B 上滴各个尺寸的微球来进行对比研究,样品 B 的 PS 小球尺寸是 415 nm,已超出分辨极限,在显微镜下能够分辨出来. 在显微镜下通过不同尺寸微球观察样品的结果如图 4 所示,可以看出通过 4 种尺寸的微球我们都能看到放大的 PS 小球的像. 本实验中观察到的像都在微球下方,故都为虚像.

尽管通过小尺寸的微球能够看到接近衍射极限的物体,但是图像不清晰. 研究表明如果把微球半浸没在液体中,成像的对比度会明显提高<sup>[14,15]</sup>. 在实验中,我们选择把微球半浸没在酒精中. 我们在样品 A、B 滴了微球的基础上再滴酒精,待酒精接近挥发干,微球半浸没于酒精时,通过各个尺寸微球观察样品得到的结果如图 5、6 所示. 从图中可知,通过 4 个尺寸的微球可以清楚地分辨出样品 A 和 B 中的 PS 小球,图

像对比度也优于直接用微球观察的像.

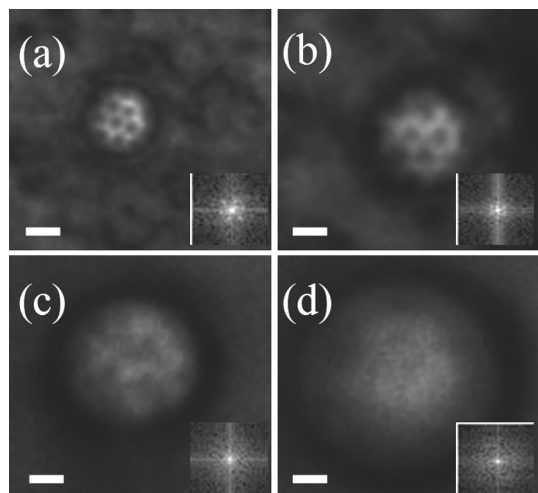


图 3 用微球直接观察样品 A, 微球的直径分别为 (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ 、(b)  $3.35\ \mu\text{m}$ 、(c)  $4.87\ \mu\text{m}$ 、(d)  $7.27\ \mu\text{m}$ , 图片右下方的插图是对图片傅里叶变换后的结果, 图中比例尺是  $1\ \mu\text{m}$

Fig. 3 Optical images of sample A through the microspheres with different diameters (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ , (b)  $3.35\ \mu\text{m}$ , (c)  $4.87\ \mu\text{m}$ , (d)  $7.27\ \mu\text{m}$ . The frequency spectra of the images are shown in the inset of Fig. 3. The scale bar is  $1\ \mu\text{m}$

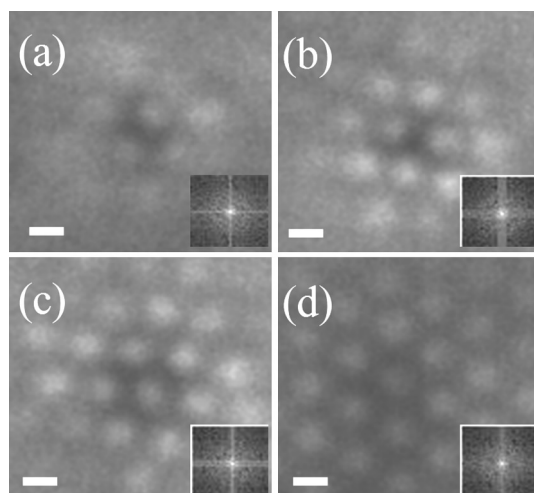


图 4 用微球直接观察样品 B, 微球的直径分别为 (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ 、(b)  $3.35\ \mu\text{m}$ 、(c)  $4.87\ \mu\text{m}$ 、(d)  $7.27\ \mu\text{m}$ , 图片右下方的插图是对图片傅里叶变换后的结果, 图中比例尺是  $1\ \mu\text{m}$

Fig. 4 Optical images of sample B through the microspheres with different diameters (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ , (b)  $3.35\ \mu\text{m}$ , (c)  $4.87\ \mu\text{m}$ , (d)  $7.27\ \mu\text{m}$ . The frequency spectra of the images are shown in the inset of Fig. 4. The scale bar is  $1\ \mu\text{m}$

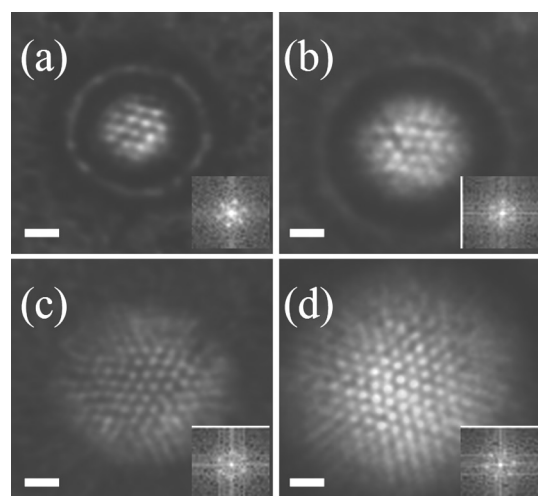


图 5 微球上滴酒精直接观察样品 A, 微球的直径分别为 (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ 、(b)  $3.35\ \mu\text{m}$ 、(c)  $4.87\ \mu\text{m}$ 、(d)  $7.27\ \mu\text{m}$ , 图片右下方的插图是对图片傅里叶变换后的结果, 图中比例尺是  $1\ \mu\text{m}$

Fig. 5 Optical images of sample A through the microspheres semi-immersed in ethanol with different diameters (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ , (b)  $3.35\ \mu\text{m}$ , (c)  $4.87\ \mu\text{m}$ , (d)  $7.27\ \mu\text{m}$ . The frequency spectra of the images are shown in the inset of Fig. 5. The scale bar is  $1\ \mu\text{m}$

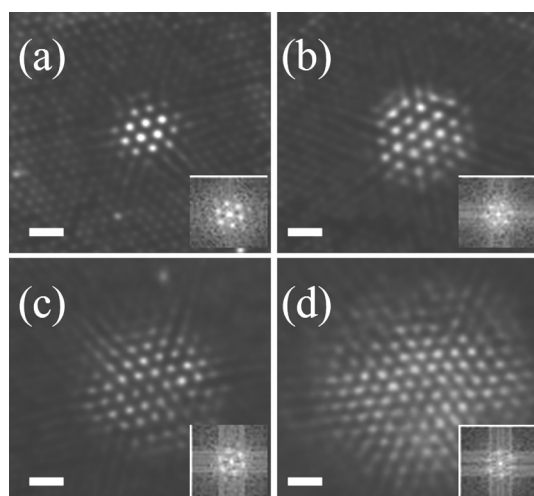


图 6 微球上滴酒精直接观察样品 B, 微球的直径分别为 (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ 、(b)  $3.35\ \mu\text{m}$ 、(c)  $4.87\ \mu\text{m}$ 、(d)  $7.27\ \mu\text{m}$ , 图片右下方的插图是对图片傅里叶变换后的结果, 图中比例尺是  $1\ \mu\text{m}$

Fig. 6 Optical images of sample B through the microspheres semi-immersed in ethanol with different diameters (a)  $1.97\ \mu\text{m}$ , (b)  $3.35\ \mu\text{m}$ , (c)  $4.87\ \mu\text{m}$ , (d)  $7.27\ \mu\text{m}$ . The frequency spectra of the images are shown in the inset of Fig. 6. The scale bar is  $1\ \mu\text{m}$

物体包含不同频率的信息, 有的反映细节, 有的反映大概轮廓, 细节对应波矢大的傅里叶分量, 而大概轮廓对应波矢小的傅里叶分量. 我们对图 3、4、5、6 进行傅里叶变换, 变换结果在每个图片的右下角, 图中中间是低频, 边缘是高频. 直接观察样品 A 时, 此时样品尺寸接近分辨极限, 图 3(a) 中对于  $1.97\ \mu\text{m}$  微球参与成像的高频成份较多, 能够看到样品中的 PS 小球, 而图 3(b) ~ 3(d) 中对于  $3.35\ \mu\text{m}$ 、 $4.87\ \mu\text{m}$ 、 $7.27\ \mu\text{m}$

$\mu\text{m}$  微球参与成像的主要是低频成份,看不到样品中的 PS 小球. 对于这个现象,我们的解释是如图 7 所示,假设同一个角度的光线在不同尺寸的微球里面传播,可以发现在大球里面传输的距离大于在小球里面传输的距离,因此消逝波在大球里面衰减更多,小球里面衰减得少,故用微球直接观察样品时,直径小的球反而能看到样品,这与图 3 的实验结果一致. 直接观察样品 B 时,由于样品尺寸远大于分辨极限,通过傅里叶分析可以看出,此时参与成像的是低频部分,通过 4 个不同尺寸

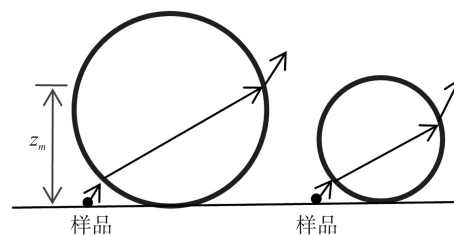


图 7 光线在微球里传播示意图

Fig. 7 Schematic of the light propagation in microspheres

微球都能分辨出样品 PS 小球. 对比图 3 和图 5、图 4 和图 6,发现有些尺寸的微球直接观测时分辨不出样品的 PS 小球,当微球用酒精半浸没后能分辨出,频谱分析表明,酒精的作用可以让更多的高频成份进入小球,利于成像.

如图 8 所示,微球透镜的焦距为  $f$ ,半径为  $r$ ,样品到微球表面的距离为  $d$ ,本实验中,微球滴在样品表明,故  $d=0$ ,因此可得到微球的成像放大率  $M$ ,  $M=f/(f-r)$ ,即放大率理论值等于物方焦距的长度,除以物体和物方焦点之间的距离. 表 1 是不同尺寸微球观察不同样品的放大率理论值和实验值. 放大率理论值是先通过 Trace Pro 光线追踪 (Trace Pro 是美国 Lambda Research 公司的产品,原理是利用近轴光线公式进行光线追踪),得到焦距  $f$ ,再代入上面的放大率计算公式得到的. 通过比较 Trace Pro 得到的放大率理论值跟实验值,我们发现通过微球直接观察时放大率理论值是  $2.7\times$ ;观察尺寸在衍射极限附近的样品时,放大率实验值是  $2.0\times$  左右,观察尺寸大于衍射极限的样品时,放大率实验值是  $3.4\times$  左右. 用酒精半浸没微球观察时,放大率理论值是  $2.0\times$ ,而其实验值是  $1.6\times$  左右. 理论值跟实验值相差较大. 以直径  $4.87\ \mu\text{m}$  的二氧化硅微球为例,通过 Trace Pro 和 COMSOL Multiphysics (COMSOL Multiphysics 是以有限元法为基础,通过求解麦克斯韦方程组来实现真实物理现象的仿真)

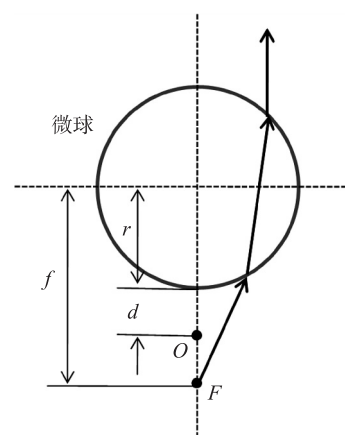


图 8 微球成像原理图

Fig. 8 Schematic of microsphere's imaging

模拟透镜焦距的结果如图 9 所示,图中  $f$  为焦距,比较图 9(a)、9(b)发现,两种软件模拟得到的焦点位置不同,COMSOL Multiphysics 模拟得到的焦距更短. 因此对微球透镜来说,不能简单地用经典几何光学来解释它的成像特征,应结合近场波动光学来解释,微球可以收集、传递消逝波,减慢消逝波衰减,从而可以在远场看到超分辨成像.

表 1 不同微球观察不同样品的放大率统计

Table 1 Comparisons of the magnification  $M$  of the images between the experimental data and the calculated data

样品名称	微球直径/ $\mu\text{m}$	放大率实验值	放大率实验值(滴酒精)	放大率理论值	放大率理论值(滴酒精)
A	1.97	2.01	1.72	2.74	2.07
A	3.35	1.95	1.65	2.72	2.03
A	4.87	—	1.65	2.73	2.02
A	7.27	—	1.63	2.76	2.04
B	1.97	3.42	1.59	2.74	2.07
B	3.35	3.34	1.61	2.72	2.03
B	4.87	3.41	1.59	2.73	2.02
B	7.27	3.40	1.71	2.76	2.04

通过分析实验数据及频谱图可发现,不同频率成份参与成像,放大率不一样,高频成份占大部分的时候,放大率小,低频成分占大部分的时候,放大率大;用酒精半浸没微球时得到的放大率小于直接用微球观察时的放大率;用微球直接观察样品时,若样品尺寸接近分辨极限,放大率小,若样品尺寸超过分辨极限,放大率大;而微球尺寸对放大率几乎没有影响.

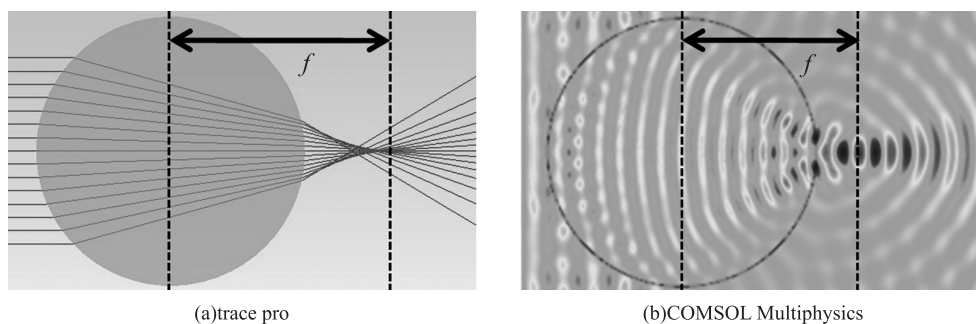
图9 物体焦点模拟图,图中 $f$ 为焦距

Fig.9 The focal plane of the object space from the center of the microsphere( $f$ ) calculated by (a) Trace Pro, (b) COMSOL Multiphysics

### 3 结论

本文在所制备的密六方排列的两种不同尺寸的PS小球样品上滴加不同尺寸的微球,让后通过光学显微镜对微球下面的样品进行观察,得出如下结论:第一,微球球径越小,接受到的高频信息越多,能分辨出细小物体的更多细节,这是由于微球尺寸越小,光线在微球里面传播的距离短,消逝波衰减得少,更利于成像.第二,当微球半浸没于酒精的情况时,酒精有把高频信息带入微球并成像的作用,故直接通过微球观察不到的样品的PS小球时,用酒精半浸没微球时,能够分辨出来,提高了成像的对比度,更利于实验观察.第三,当不同频率成份参与成像时,放大率不一样,高频成份多,放大率小,成像对比度好,低频成份多,放大率大,成像对比度差.我们的研究表明,微球透镜的成像性质不能用简单的经典几何光学来解释,应该结合波动光学.本文研究将对今后光学超分辨率成像的研究提供帮助,此外微球的超分辨成像在实时观察生物上的微纳米尺寸的细胞等领域也具有潜在的应用价值.

#### [参考文献]

- [1] Pendry J B. Negative refraction makes a perfect lens[J]. Physical Review Letters, 2000, 85(18): 3 966–3 969.
- [2] Fang N, Lee H, Sun C, et al. Sub-diffraction-limited optical imaging with a silver superlens[J]. Science, 2005, 308(5721): 534–537.
- [3] Zhang X, Liu Z. Superlenses to overcome the diffraction limit[J]. Nature Materials, 2008, 7(6): 435–441.
- [4] Kawata S, Inoué Y, Verma P. Plasmonics for near-field nano-imaging and superlensing[J]. Nature Photonics, 2009, 3(7): 388–394.
- [5] Hell S W, Schmidt R, Egner A. Diffraction-unlimited three-dimensional optical nanoscopy with opposing lenses[J]. Nature Photonics, 2009, 3(7): 381–387.
- [6] Rho J, Ye Z, Xiong Y, et al. Spherical hyperlens for two-dimensional sub-diffractive imaging at visible frequencies[J]. Nature Communications, 2010, 1(1): 1–5.
- [7] Van Putten E G, Akbulut D, Bertolotti J, et al. Scattering lens resolves sub-100 nm structures with visible light[J]. Physical Review Letters, 2011, 106(19): 193905–1–193905–4.
- [8] Rogers E T F, Lindberg J, Roy T, et al. A super-oscillatory lens optical microscope for subwavelength imaging[J]. Nature Materials, 2012, 11(5): 432–435.
- [9] Lu D, Liu Z. Hyperlenses and metalenses for far-field super-resolution imaging[J]. Nature Communications, 2012, 1205(3): 1–9.
- [10] Lemoult F, Fink M, Lerosey G. A polychromatic approach to far-field superlensing at visible wavelengths[J]. Nature Communications, 2012, 889(3): 1–8.
- [11] Fletcher D A, Crozier K B, Quate C F, et al. Near-field infrared imaging with a microfabricated solid immersion lens[J]. Applied Physics Letters, 2000, 77(14): 2 109–2 111.
- [12] 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(7254): 498–501.
- [13] Wang Z, Guo W, Li L, et al. Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope[J]. Nature Communications, 2011, 218(2): 1–6.

- [14] Hao X, Kuang C, Liu X, et al. Microsphere based microscope with optical super-resolution capability [J]. Applied Physics Letters, 2011, 99(20): 203102-1-203102-3.
- [15] Hao X, Kuang C, Li Y, et al. Hydrophilic microsphere based mesoscopic-lens microscope (MMM) [J]. Optics Communications, 2012, 285(20): 4130-4133.
- [16] 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): 34207-34207.
- [17] Li L, Guo W, Yan Y, et al. Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy [J]. Light: Science and Applications, 2013, 2(9): e104-1-e104-9.
- [18] Ye R, Ye Y H, Ma H F, et al. Experimental far-field imaging properties of a  $\sim 5\text{-}\mu\text{m}$  diameter spherical lens [J]. Optics Letters, 2013, 38(11): 1829-1831.
- [19] Chen Z, Taflove A, Backman V. Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles: a potential novel visible-light ultramicroscopy technique [J]. Optics Express, 2004, 12(7): 1214-1220.

[责任编辑:顾晓天]