

# 突破衍射极限的远场光学成像方法

王云新<sup>1,2</sup>, 郭莎<sup>1</sup>, 王大勇<sup>1,2</sup>, 戎路<sup>1,2</sup>, 林巧文<sup>1</sup>, 王敏超<sup>1</sup>

(1. 北京工业大学 应用数理学院, 北京 100124; 2. 北京市精密测控技术与仪器工程技术研究中心, 北京 100124)

**摘要:** 随着人们对微观世界探索的不断深入,在纳米科技和生命科学等领域要求成像系统的分辨率达到微纳尺度. 远场成像技术具有工作距离远、无损伤等优点,但由于衍射极限的存在,限制了其往更高分辨率方向的发展,因而突破衍射极限的远场成像技术成为了研究的热点. 介绍了突破衍射极限的基本原理,综述了近年来通过非线性效应、特殊光照明、耦合元件和微球收集倏逝波突破衍射极限的远场光学成像方法,阐述了其在生物成像领域的应用,最后给出了突破衍射极限的远场成像的发展趋势.

**关键词:** 超分辨率; 远场; 衍射极限

**中图分类号:** O 439; O 438. 2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0254 - 0037(2015)12 - 1799 - 11

**doi:** 10. 11936/bjtxb2015070010

## Breaking Through the Diffraction Limit Using Far-field Optical Imaging Methods

WANG Yun-xin<sup>1,2</sup>, GUO Sha<sup>1</sup>, WANG Da-yong<sup>1,2</sup>, RONG Lu<sup>1,2</sup>, LIN Qiao-wen<sup>1</sup>, WANG Min-chao<sup>1</sup>

(1. College of Applied Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;

2. Beijing Engineering Research Center of Precision Measurement & Control Technology and Instruments, Beijing 100124, China)

**Abstract:** With the exploring of microscopic world, nano-technology and life science have been investigated under micron and nano scales. Compared with near-field imaging methods, far-field microscopic technique has many advantages, such as long working distance and non-damage. However, the resolution of far-field imaging is restrained by the diffraction limit. How to overcome this limit has become the focus of many research areas. In this paper, the principle of breaking through the diffraction limit is introduced. The latest far-field methods based on the nonlinear effect, special light illumination, coupling elements and microsphere are briefly reviewed including their biomedical applications. Finally, the trend of the methods, which overcomes the diffraction limit in far field, is given.

**Key words:** super-resolution; far-field; diffraction limit

由于阿贝衍射极限的存在,基于白光照明的传统光学显微镜分辨率被限制在 $\lambda/2$ , $\lambda$ 为入射光的中心波长,因此迫切需要发展突破衍射极限的超分辨率成像技术. 超分辨率技术一出现就引起广泛关注,先是在2006年被 *Science* 杂志评为年度十大技术突破,接着被 *Nature Methods* 评为2008

年年度方法. 在2014年 *Nature Methods* 10周年特刊评出的10年十大技术中,超高分辨率荧光显微成像和单分子技术都出现在榜中,并获得2014年诺贝尔化学奖. 这些突破衍射极限的成像技术在纳米探测和生物科学领域发展迅速,已被应用于观测细胞的膜蛋白分布、细胞骨架、线粒体、染色

收稿日期: 2015-06-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61205010); 北京市教育委员会科技项目(KM201310005031)

作者简介: 王云新(1981—),女,副教授,主要从事数字全息显微成像、高分辨率光学成像、微波光子学方面的研究, E-mail: yxwang@bjut.edu.cn

质、神经元突触以及原核生物等生物样品. 因此开展突破衍射极限的远场成像技术的研究对生物医学领域具有重要的应用价值.

突破衍射极限的超分辨率成像技术可以分为近场成像技术和远场成像技术. 能够突破衍射极限, 实现小于  $\lambda/2$  的分辨率的近场方法有很多. 比如电子显微镜<sup>[1]</sup>, 它是利用光的波粒二相性, 用电子代替光子, 在电磁透镜的作用下在荧光屏上成像, 已达到 0.1 nm 的超高分辨率. 但是其工作环境为真空, 不能用于活细胞的探测. 原子力显微镜利用探针与样品之间的相互作用力, 得到样品表面形貌, 可达到原子尺度的分辨率<sup>[2]</sup>. 扫描隧道显微镜根据样品表面分子中的电子隧道电流来测定样品的表面形貌, 其横向分辨率能够达到 0.1 nm<sup>[3]</sup>. 近场扫描光学显微镜 (scanning near-field optical microscope, SNOM)<sup>[4-5]</sup>, 是通过使用一个远小于衍射极限的探针照明样品, 离物体表面很近 (一个波长量级), 探针会收集到样品表面附近的倏逝波, 实现纳米量级的分辨率<sup>[6-8]</sup>. 这些方法虽然能够得到极高的分辨率, 但是实验设备复杂, 获取速度慢, 价格昂贵, 并且对样品的制备有很高的要求, 不适于对活细胞的相衬成像. 与上述介绍的突破衍射极限的近场成像方法相比, 远场成像技术具有无损伤、设备简单、工作距离远等优点, 因此研究突破衍射极限的远场成像技术, 具有重要的理论价值和实用意义. 本文首先介绍了远场突破衍射极限的基本原理, 然后概述了近年来利用非线性效应、特殊光照明、耦合元件和微球来收集倏逝波的方法, 并分析了每种方法的优缺点, 最后给出了超分辨率的发展趋势.

## 1 突破衍射极限的基本原理

系统的点扩散函数 (point spread function, PSF) 和光学传递函数 (optical transfer function, OTF) 都可以作为评价系统分辨率的函数. 根据瑞利判据 (Rayleigh criterion)<sup>[9]</sup>, PSF 的半高全宽 (full width at half maximum, FWHM) 为成像系统的分辨率, 通过计算得到传统光学显微镜的分辨率为  $\delta = 0.61\lambda/NA$ , 式中 NA 为系统的数值孔径. OTF 表征能够通过光学系统的各种频率所占比重的函数, 由于成像系统的数值孔径有限, 使高频信息不能全部通过. OTF 越宽说明系统能够收集的物体的高频信息越多, 系统分辨率就越高.

为了突破衍射极限, 就必须获得小于衍射极限

的 PSF 或是使 OTF 拓宽至倏逝波范围. 下面分析近场倏逝波和远场传输波的不同, 并讨论 2 种波和物体信息的对应关系. 假设一束物光波在  $z=0$  处的空间平面  $(x_0, y_0, 0)$  处的复振幅分布为  $u_0(x_0, y_0)$ . 光波沿波矢  $\mathbf{k}$  方向传播, 传播距离  $z_0$  时, 光波的复振幅分布为  $u(x, y)$ , 如图 1 所示. 分别对  $u_0$ 、 $u$  进行傅里叶变换, 得到相应的频谱分布分别为  $A_0(\cos \alpha/\lambda, \cos \beta/\lambda)$ , 其中  $\cos \alpha$ 、 $\cos \beta$  为传播方向的方向余弦. 根据角谱衍射理论<sup>[10]</sup>可得

$$A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}\right) = A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}\right) \cdot \exp\left(\sqrt{1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta}\right) \quad (1)$$

当传播方向余弦  $(\cos \alpha, \cos \beta)$  满足  $\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta < 1$  时, 物体的信息都能够传输到远场, 该频率成分的光波是远场传输波, 只要系统的数值孔径足够大, 都能参与成像.

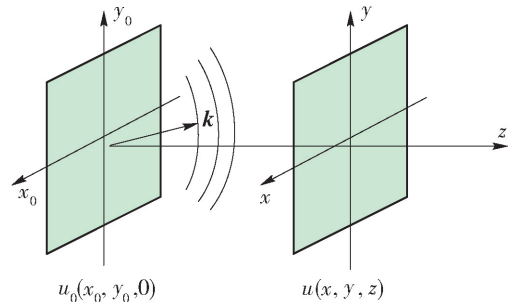


图 1 衍射传播示意图

Fig. 1 Diagram of diffraction propagation

当  $\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta > 1$  时, 式(1)中的平方根为虚数, 式(1)可简化为

$$A\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}\right) = A_0\left(\frac{\cos \alpha}{\lambda}, \frac{\cos \beta}{\lambda}\right) \exp(-j\mu z) \quad (2)$$

式中  $\mu = k \sqrt{\cos^2 \alpha + \cos^2 \beta - 1}$ ,  $\mu$  为虚数, 表明物光波在  $z$  轴方向按负指数规律迅速衰减. 这部分信息就是近场倏逝波, 它在一个波长距离内迅速衰减, 不能传播到远场参与成像. 如果想拓宽 OTF 至倏逝波范围, 实现超衍射极限的分辨率, 就必须收集近场倏逝波, 使其参与成像.

## 2 远场成像方法

### 2.1 非线性效应成像

1994年, 德国科学家 Hell 等提出了受激发射损耗 (simulated emission depletion, STED) 荧光显微技术<sup>[11-12]</sup>. STED 方法基于饱和吸收的非线性效

应,通过激发光和损耗光的设计得到小于衍射极限的光斑,从而压缩了 PSF 的尺度,实现了 66 nm 的分辨率<sup>[13]</sup>.

STED 的基本原理如图 2 所示,所用的激发光(蓝色)和 STED 激光(橙色)波长分别为 470 nm 和 615 nm. 其中 STED 激光是经过调制后的空心光束,其与激发光同时照射到样品上. 激发光将荧光分子激活,而 STED 光将荧光猝灭. 如果两束光同时照射样品,则只会得到 STED 光中心圆点大小的发射荧光区域(绿色). 如果将中心区域限制在小于衍射极限大小,就会得到小于衍射极限的光斑. 系统光斑强度的半高全宽的表达式为  $\lambda/(2n\sin\alpha)$ , STED 方法使荧光发光点的强度半高全宽减小为  $\lambda/[2n\sin\alpha\sqrt{1+I_{\max}/I_{\text{sat}}}]$ ,其中  $I_{\max}$  为 STED 激光的光强最大值,  $I_{\text{sat}}$  为荧光分子的饱和吸收光强,  $n\sin\alpha$  为透镜的数值孔径. 可见  $I_{\max}/I_{\text{sat}}$  越大,系统的分辨率就越高. 目前报道的 STED 方法通过使用特殊的荧光材料,分辨率最高可达到 6 nm<sup>[14]</sup>.

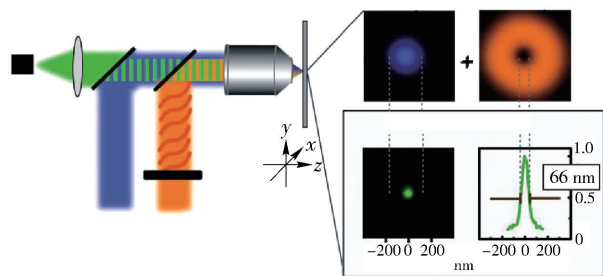


图 2 STED 荧光显微镜的原理<sup>[13]</sup>

Fig. 2 Principle of STED fluorescence microscopy<sup>[13]</sup>

在同一时期, Hell 等提出了基态损耗(ground state depletion, GSD)<sup>[15]</sup>. GSD 与 STED 的基本思想一致,都是将产生荧光区域缩小至小于衍射极限大小. 但是 GSD 显微镜首先用环形的 GSD 光照射样品,直至将照射区域的所有荧光分子的基态电子

耗尽,并全部处于其长寿命的能级,使其不发射荧光. 然后用激发光激发荧光分子,这样没有被 GSD 光照射的中心区域的分子会被激发并发射荧光,从而压缩了 PSF 尺度. 这种方法所用的 GSD 光的饱和光强较小,有效减少了入射光对样品的损伤与漂白,这种方法分辨率可达到 50 ~ 80 nm<sup>[16]</sup>. 但是处于亚稳态能级的电子也有可能跃迁回基态,当激发中心区域的荧光分子时,周边的荧光分子也会参与荧光成像,这一作用会拓宽荧光点边缘,这也是实际分辨率没有计算值高的主要原因.

STED 方法可以用于细胞器的观察. Wurm 等通过 STED 方法得到了细胞外膜的移位酶的分布,表明纳米尺度线粒体的分布取决于细胞的生存环境、细胞分布密度和细胞膜电位<sup>[17]</sup>. STED 方法还可以实现对细胞的双色成像<sup>[18-20]</sup>. 如果将 STED 方法与其他技术结合起来可达到更好的效果. 将荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)与 STED 结合,可以拓展 STED 方法的染料选择范围,对细胞进行多色成像<sup>[21]</sup>. 将双光子激发荧光扫描显微镜(2PLSM)与 STED 方法结合,可以实现对生物厚活体组织的高分辨层析成像<sup>[22]</sup>.

STED 方法是一种直接成像方法,无需后期处理过程,成像结果可靠. 但想要获得较高的分辨率,就需要以牺牲成像速度和成像范围为代价,而且这种方法的系统光路复杂、价格昂贵.

## 2.2 特殊光照明成像

特殊光照明即为用经过调制后的光照射样品,将不可分辨的物体的高频信息频移到较低频域中,通过数值计算对图像进行重建,得到超分辨率图像.

### 2.2.1 结构光照明

2005 年, Gustafsson 提出了结构光照明显微方法(structured illumination microscopy, SIM)<sup>[23]</sup>,其基本原理如图 3 所示,本质是用光强分布为正弦

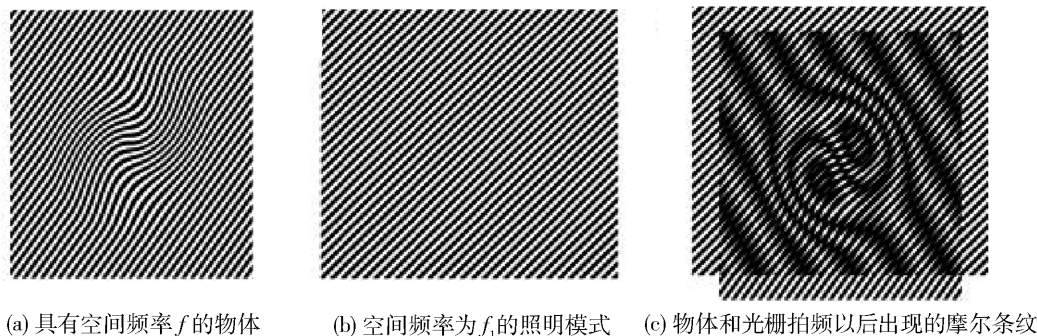


图 3 结构光照明显微(SIM)的基本原理<sup>[23]</sup>

Fig. 3 Principle of structured illumination microscopy (SIM)<sup>[23]</sup>



分布的结构光照射物体,获取物体更多的高频信息.

若物体所包含的高频信息 $f$ 超过了显微物镜能够收集到的最大频率 $f_0$ ,则成像系统将无法探测到物体的这部分高频信息.将照明光调制为光强分布为正弦分布,频率为 $f_1$ 的结构光.物体与光栅拍频(beat frequency)后会产生一个空间频率为 $f_m = |f - f_1|$ 的低频莫尔条纹(Moiré fringes),使其落入到系统的通频带内,探测器便可以采集到该低频莫尔条纹.这一条纹中包含有物体的高频信息,通过软件解码即可得到物体的高频信息.由于入射光的频率 $f_1$ 受到衍射极限的限制,所以SIM方法提高的分辨率是有限的<sup>[24]</sup>.

根据这一原理,如果调制光栅只是一维周期

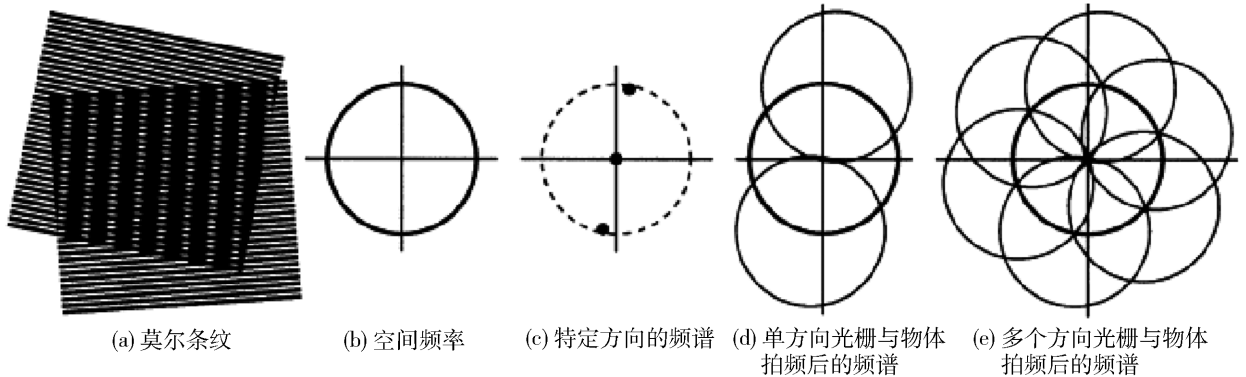


图4 结构光扩展 OTF 的原理

Fig. 4 Principle of extending the OTF through structure light

通过光栅模板和2束光干涉的方法都可以得到光强分布为正弦分布的结构光<sup>[25-28]</sup>.这2种方法产生的都是一维的光栅周期分布的结构光,只能提高横向的分辨率.如果用三维周期分布的结构光照明光场,就可以实现三维空间的超分辨率成像<sup>[29]</sup>.2008年,美国的Gustafsson小组<sup>[30]</sup>分别使用三光束干涉SIM和六光束干涉SIM进行生物实验,纵向及横向空间分辨率均达到了100 nm<sup>[31]</sup>.三维结构光照明荧光显微镜(3D-SIM)的出现得到了广泛的关注.许多学者利用这一技术得到了生物样品的三维图像.姚等采用基于数字微镜器件的LED结构光照明系统<sup>[32]</sup>获得了具有一定厚度的花粉颗粒的三维图像.Fitzgibbon等<sup>[33]</sup>利用三维结构光照明荧光显微镜,借助烟草中绿色荧光蛋白标记的病毒运动蛋白获得胞间连丝的超分辨图像.还有通过改进或与其他技术结合获得更好的成像效果<sup>[34-35]</sup>.利用多色3D-SIM方法可以实现对细胞核的多种物质同时成像.将3D-SIM与光学造影剂结合,可以将癌细胞

结构,且只有一个方向,这种情况只能提高一个方向的分辨率.如果把调制光栅进行旋转,即可提高多方向上的分辨率.横向调制光激发显微镜(laterally modulated excitation microscopy, LMEM)<sup>[25-26]</sup>就是应用这一原理,其拓展OTF的过程可由图4说明.通过旋转光栅的方向,拓展不同方向的OTF.图4(a)为物体与光栅拍频得到的莫尔条纹.图4(b)为物体的空间频率.图4(c)为某个特定方向的光栅的频谱,有3个级次.图4(d)为一个方向的光栅与物体拍频后的频谱图.图4(e)为多个方向光栅与物体拍频后的频谱图,从图中可看出通过旋转光栅,将不同方向的高频信息都移到通频带内,之后通过软件解码即可得到物体的高频信息.

与正常细胞分开,为宫颈癌的检测提供了一种方便快捷的方法.

利用SIM方法获得重建三维像,需要特定的重构算法,而重构算法直接影响到信息的准确性.2015年,姚等提出了一种基于SIM的新的光学切片算法:一维序列希尔伯特变换算法(sequence Hilbert transform, SHT)<sup>[36]</sup>,有望对生物活细胞实现快速的三维重建.

## 2.2.2 倏逝波照明

任意样品被光场照明时,光场分布可表示为

$$U_{\text{out}} = U_i \cdot U_o \quad (3)$$

式中: $U_i$ 为照明光的光场分布; $U_o$ 为样品的透过率函数.将式(3)进行傅里叶变换,得到

$$\begin{aligned} \mathcal{A}(U_{\text{out}}) &= k_{\text{out}}(k) = \mathcal{A}(U_i) \otimes \mathcal{A}(U_o) = \\ &= k_i(k) \otimes k_o(k) \end{aligned} \quad (4)$$

当照明光为单色平面光时, $k_i = (k - k_{i\parallel})$ ,因此式(4)可以进一步简化为

$$k_{\text{out}}(k) = (k - k_{i\parallel}) \cdot k_o \quad (5)$$

式中  $k_{i\parallel}$ 、 $k_o$  分别为入射光波数和样品光波数。

可见, 利用倾斜光照明物体, 在频域来看相当于对物体的频谱信息进行频谱位移操作. 如果利用更高频率的倏逝波照明, 则可将物体衍射的高频倏逝波转换为可远场传输的传输波. 图 5 为原理图, 图中  $k_e$  为倏逝波分量;  $k_{out}$  为移频后的传输波分量;  $k_A$  为移频步长;  $k_m$  为最大系统带宽. 当采用倏逝波照明时, 能观察的样品的分量为  $k_e - k_m < k_{out} < k_e + k_m$ . 其中  $k_m \sim k_e + k_m$  为原有的倏逝波分量, 即为物体的高频信息<sup>[37]</sup>. 通过照明将该部分信息转化为远场传输波, 使其参与成像, 进而突破了衍射极限<sup>[38]</sup>.

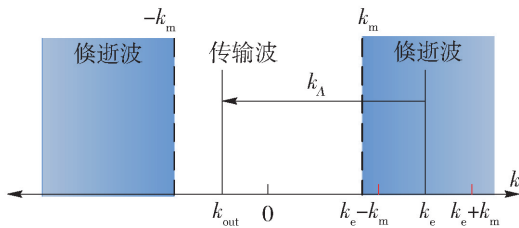


图 5 倏逝波频移原理

Fig. 5 Principle of shifting the evanescent wave

2013 年, 浙江大学现代光学仪器国家重点实验室使用一个纳米光纤 (尺度在百纳米至微米量级之间) 作为照明光源, 纳米光纤是以空气作为包层的特殊阶跃型波导. 纳米光纤导入倏逝波, 在样品表面可以产生较强的倏逝波场<sup>[39]</sup>, 并通过实验验证了其可行性. 实验光路如图 6 所示, 显微镜的放大倍率为 100 倍,  $NA = 0.8$ , 在工作波长为 600 nm 的条件下, 系统的分辨率达到 75 nm, 突破了衍射极限.

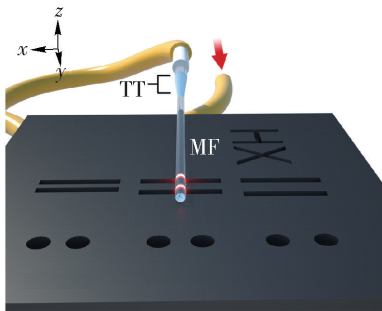


图 6 基于微光纤的超分辨成像系统三维示意图<sup>[40]</sup>

Fig. 6 Schematic of super-resolution imaging system based on micro-fiber<sup>[40]</sup>

上述方法结构简单、易于实现, 可以应用于金属和非金属样品表面结构的测量. 但是由于光纤的直径限制在  $1 \sim 3 \mu\text{m}$ , 所以限制了单次成像的视场范围. 由于光纤很柔软, 需要精确的转台机构实现纳

米光纤围绕样品台旋转, 并且不发生颤动而影响角度定位精度, 实验设备要求高. 同年, 该课题组又提出了利用光的全反射产生倏逝波照明代替光纤产生倏逝波<sup>[41]</sup>. 采用全反射荧光显微镜的模式, 利用棱镜发生全反射, 光路如图 7 所示. 使用的照明光波长为 635 nm, 分辨率达到了 90 nm. 其基本原理就是照明倏逝波与物体倏逝波发生作用, 使物体倏逝波转化为远场传输波并参与成像, 突破衍射极限. 与用微光纤方法相比, 这种方法具有宽视场和照明角度可调的优点.

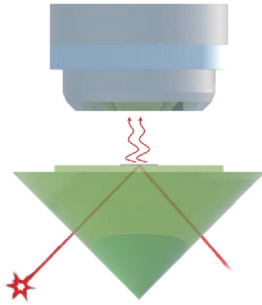


图 7 基于全反射产生倏逝波照明的成像方法<sup>[41]</sup>

Fig. 7 Schematic of this illumination method used the evanescent wave generated by the total reflection<sup>[41]</sup>

在上述的特殊光照明方法中, SIM 方法属于宽场成像技术, 可以拓宽横向和纵向的分辨率. 但是这种方法的分辨率还是会受到衍射极限的限制. 最新提出的倏逝波照明的成像方法还极少应用到生物成像方面, 但是这种方法简单方便, 有望在细胞成像领域中得到广泛应用. 对于倏逝波照明的成像方法, 如何精确控制入射光的方向是该方法的技术难点. 特殊光照明方法都是通过对照明光进行编码, 实现将高频分量转化为低频分量, 所以均需要再现算法还原待测样品的信息.

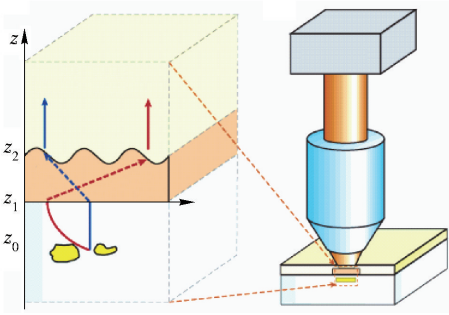
### 2.3 基于耦合元件的成像

基于耦合元件的成像方法通过在近场加入耦合元件, 收集近场倏逝波, 传播到远场, 参与成像. 这里主要介绍远场超级透镜和双曲透镜 2 种方法.

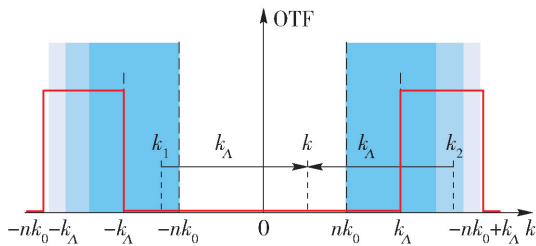
#### 2.3.1 远场超级透镜

在近场超级透镜 (near-field super lens, NFSL)<sup>[42]</sup> 的基础上, 将放大的倏逝波通过紧邻的耦合元件光栅转化成远场传输波, 传播到远场参与成像, 得到突破衍射极限的远场像, 这就是远场超级透镜 (far-field superlens, FSL)<sup>[43-46]</sup>. 光路如图 8 所示.

Liu 等<sup>[43]</sup> 在 NFSL 基础上, 增加了一个周期波

图8 亚波长成像远场超级透镜示意图<sup>[44]</sup>Fig. 8 Schematic of far-field superlens (FSL) for subwavelength imaging<sup>[44]</sup>

纹光栅作为耦合器。利用光栅的频移作用,将携带物体高频信息的倏逝波调制到低频的传播波区域。这样放置在薄银板近场区域的样品,其倏逝波首先被近场超级透镜放大,然后经过光栅调制作用传输到达远场,从而在传统光学显微镜下就可以清晰地看到亚波长细节。FSL的工作原理如图9所示。图9表示远场超级透镜将系统的OTF拓展为 $(nk_0 < |k| < nk_0 + k_\Lambda)$ ,其中 $n$ 为周围介质的折射率; $k_0$ 和 $k_\Lambda$ 分别为真空中光的零级衍射频率和光栅的频率。物光波经过光栅频移以后,以显微镜最终探测到的 $k$ 频率为例, $k_1$ 、 $k_2$ 分别是物体频率频移之前的2个频率信息。因为 $k_1$ 的强度为零,所以要得到 $k$ 只要通过图像恢复算法得到物体的倏逝波 $k_2$ 。如果 $k_1$ 、 $k_2$ 都不为零,则不能正确恢复出原来的信息。

图9 远场超级透镜系统的OTF<sup>[44]</sup>Fig. 9 Ideal OTF of FSL<sup>[44]</sup>

由于存在频域混叠,无法实现重建,为此需要对耦合元件进行特殊设计,使倏逝波转换成的传播波分量与原始的传播分量不发生交叠<sup>[44-48]</sup>,从而保证重建过程的单值性。利用该方法实现的平板透镜光刻(planar lens lithography, PLL),在远场可以实现 $\lambda/4$ 分辨率<sup>[42,49]</sup>,超越了传统光刻技术中的分辨率极限。然而,由于可传播频率范围有限,只能让一部分倏逝波分量转化成传播波,因此该远场成像透镜的超分辨率能力也受到一定的局限。

在上述远场超级透镜的基础上,兰州大学设计了一种新型的、具有较好成像质量的多层远场超级透镜(multi-layer far-field superlens, MLFSL)<sup>[50]</sup>,利用正/负折射率材料交替构成的薄银板阵列结构有效地减小了单层银板的吸收损耗,对物体所发出的倏逝波分量进行放大;然后通过周期性的光栅结构将其调制到传播波段,并传播到远场;在远场同样通过光栅结构将占据传播波段的隐逝波调制回隐逝波段;最后再通过第2组薄银板阵列再一次对隐逝波进行放大并重建图像,可以得到更好的成像质量。

### 2.3.2 双曲透镜

2006年, Jacob等<sup>[51]</sup>首次提出了双曲透镜模型,与远场透镜一样,都是将近场倏逝波转换为远场传输波。但是成像机理却与远场超级透镜有着本质的区别。利用具有负介电常数实部的金属 $\epsilon_m$ 和介质 $\epsilon_d$ 构成圆柱各向异性很强的超颖材料,通过合理设计各层厚度 $l_m$ 、 $l_d$ ,利用等效介质理论,可以得到电磁波在其中表现出的色散关系为

$$\frac{k_r^2}{\epsilon_\theta} - \frac{k_\theta^2}{|\epsilon_r|} = \frac{\omega^2}{c^2} \quad (6)$$

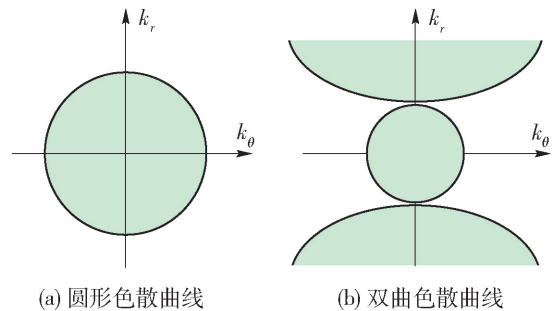
式中: $k_r$ 、 $k_\theta$ 分别表示径向和切向波矢分量; $\epsilon_r$ 、 $\epsilon_\theta$ 分别为径向和切向介电常数; $\omega$ 为角频率; $c$ 为真空中的光速。

式(6)构成双曲线形式的等频率轮廓,如图10(b)所示,倏逝波在内部转换为远场传输波,将更多的细节信息传输到远场参与成像,因此,可以突破衍射极限,实现超分辨率成像。

当 $\epsilon_r = \epsilon_\theta = \epsilon = n^2$ 时,式(6)可以改写为

$$k_r^2 + k_\theta^2 = \epsilon \frac{\omega^2}{c^2} \quad (7)$$

此时等频率轮廓图为圆形,如图10(a)所示,且圆半径为 $r = \sqrt{\epsilon} \frac{\omega}{c} = nk_0$ 。从成像的角度看,处于圆以



(a) 圆形色散曲线

(b) 双曲线色散曲线

图10 在各向同性和各向异性媒质中不同的色散关系等频率轮廓曲线

Fig. 10 Different dispersion relations of same frequency contour curve in isotropic and anisotropic medium



内的波是可以传输到远场参与成像的,但是处于圆以外的波为倏逝波,无法辐射出去参与成像. 所以扩大圆的面积,就是扩大了系统的 OTF,而圆的面积由半径决定,半径正比于媒质的折射率,因此高折射率材料可以提高分辨率. 油浸物镜和固浸透镜就是利用这个原理来提高系统的数值孔径. 由于受到了材料折射率的限制,分辨率也受到了限制.

随后,加州大学伯克利分校的 Xiang Zhang 小组<sup>[52]</sup>做了相关实验,使用 35 nm 厚的银和 35 nm 厚的氧化铝交替镀在圆柱面上,制作出 16 层银-氧化铝环形交替单元构成的半圆柱形双曲透镜,结构如图 11 所示,用 365 nm 波长照射具有亚波长结构的物体,得到了 130 nm 的分辨率<sup>[51-53]</sup>. 兰州大学<sup>[54]</sup>用铝代替银,二氧化钛代替三氧化二铝构造半圆柱双曲透镜,优化后的双曲透镜可以实现 10 nm 的分辨率.

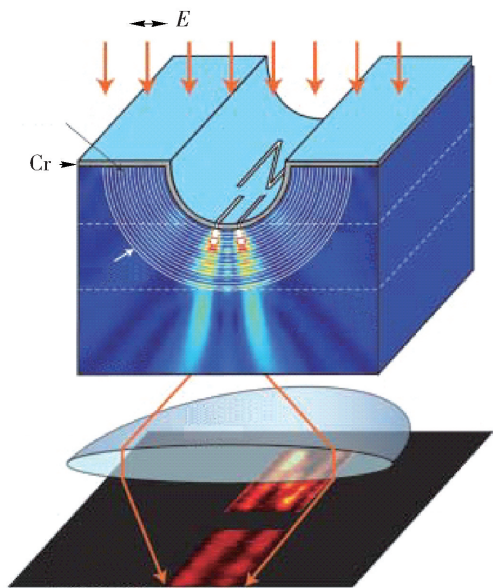


图 11 具有放大功能的双曲透镜结构<sup>[52]</sup>

Fig. 11 Schematic of optical hyperlens with magnifying function<sup>[52]</sup>

远场超级透镜和双曲透镜虽然可以实现很高的分辨率,但是对制作工艺要求比较高,结构复杂,精度要求高.

## 2.4 微球纳米显微镜

2010 年, Wang 等<sup>[55]</sup>使用 2 ~ 9  $\mu\text{m}$  的  $\text{SiO}_2$  微球实现了 50 nm 的分辨率. 结构与固体浸透透镜很相似,如图 12(d) 所示. Darafsheh 等<sup>[56]</sup>用几何方法将普通的显微物镜和 2 种固浸透镜和基于微球的显微物镜的数值孔径和放大倍率做了对比,最后得到微球的半孔径角最大,放大倍率最大,虚

像所成位置到样品的距离最大. 而且与 SIL 对比而言,操作简单,易于实现.

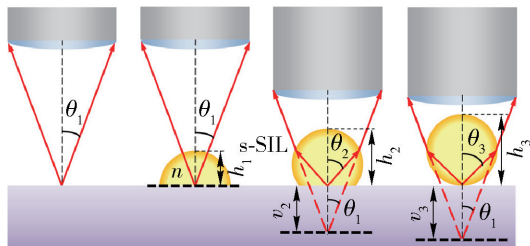


图 12 显微镜结构示意图<sup>[56]</sup>

Fig. 12 Schematic of micro<sup>[56]</sup>

Wang 等对微球突破衍射极限方法进行了初步的探索和验证. 验证了微球可以将倏逝波转化为远场传输波. 随后不断有人对该方法提出改进,将  $\text{SiO}_2$  浸于水、乙醇或者是油中,或者是用钛酸钡微球浸于异丙醇中,都观察到了蓝光光盘的 120 nm 左右周期结构<sup>[57-60]</sup>. Li 等<sup>[61]</sup>首次将微球应用于生物成像,他们用微球浸水的结构,观察到了 75 nm 大的腺病毒的结构. 这种方法在生物成像中具有无需荧光标记和着色的优点. 将高折射率的微球浸在聚二甲硅氧烷形成的膜里面,用此方法进行了癌细胞的实验,观察到了双链 DNA 的断裂,为 DNA 损伤探测提供了很好的方法,该方法在生物医学成像中具有很好的应用前景<sup>[62]</sup>. 微球纳米显微镜实验方法设备简易,操作简单. 但是这 2 种方法都要求与物体接触,如果与物体离开一段距离就会影响成像质量.

表 1 总结了本文中的几种超分辨率成像方法的基础原理、分辨率水平和优缺点. STED 虽然可以获得较高的分辨率,而且可以对细胞器进行实时成像,但是此种方法需要的设备比较昂贵. SIM 分辨率不是很高,但是可以得到样品的三维图像. 通过耦合元件来提高分辨率的方法,分辨率很高,但是耦合元件的结构复杂,对制作工艺精度要求比较高,而且大部分应用到强度型样品的检测,极少应用到生物细胞成像方面. 倏逝波照明的方法不仅分辨率高,而且不需要复杂的加工工艺,有望在超分辨率细胞成像领域中广泛应用. 微球的方法简单方便,分辨率高,可以一次曝光提高所有方向的分辨率,而且也逐渐应用到了细胞病毒方面的成像. 如果将这些方法与其他技术方法结合,比如数字全息、光镊技术、光刻技术等,有望实现一种价格低廉、超高分辨率、可快速对活体细胞实时成像的技术.

表1 各种突破衍射极限超分辨率成像方法的对比  
Table 1 Comparison of various super-resolution methods

成像方法	基本原理	分辨率	优点	缺点
受激发射损耗荧光显微技术(STED)	第1束激光用于激发荧光分子,第2束激光将激发光斑焦点外围的荧光猝灭,得到小于衍射极限的光斑大小,从而压缩了PSF的尺度小到焦点中心的大小	$\lambda/20$	没有后期处理过程,成像结果可靠	系统光路复杂,价格昂贵
结构光照明(SIM)	经过调制后的光照射样品,将不可分辨的物体的高频信息频移到较低频域当中,通过数值计算进行图像重建,得到超分辨率的图像	$\lambda/2$	宽场成像,可实现三维重建,操作简单	需要精确的重建算法,受衍射极限的限制
倏逝波照明	照明倏逝波与物体倏逝波发生作用,使物体倏逝波转化为远场传输波并参与成像,突破衍射极限	$\lambda/7$	宽场成像,可以拓宽横向和纵向的分辨率,结构简单	需要精确的重建算法,受衍射极限的限制
远场超级透镜	将放大的倏逝波通过周期褶皱的光栅,转化为远场传输波并参与成像,突破衍射极限	$\lambda/4$	工作距离远,实验设备简单	需要重建算法,制作工艺要求比较高,结构复杂,精度要求高
双曲透镜	多层金属-介质交替构成同心圆环柱结构,形成具有双曲线形式的色散-频率关系的各向异性人工电磁材料,可以将隐逝波转换成传播波,突破衍射极限	$\lambda/4$	结构简单、可靠性高、易于实现	制作工艺要求比较高,结构复杂,精度要求高
微球纳米显微镜	微球可以将倏逝波转化为远场的传输波,突破衍射极限	$\lambda/8$	可实现多方向超分辨率且微球廉价,操作简单	微球要与物体接触

### 3 发展趋势

近年来突破衍射极限的远场成像得到了广泛关注和快速发展,二维成像逐渐向三维成像发展,并且实际应用要求进一步提高成像速度、扩大视场,这些都成为远场成像技术的主要发展方向。

1) 高分辨三维成像. 在生命医学领域,希望能从分子、原子的尺度揭示生命过程的物理本质或是探测病毒结构,并且对成像要求不仅仅满足于二维成像,还要获得定量的三维信息. 而目前实现的三维成像技术,分辨率有限,无法与电子显微镜0.1 nm的分辨率相媲美,甚至有些成像技术只能提供二维信息. 为此,有必要将多种成像方法相结合,实现优势互补,如Hell小组<sup>[63]</sup>将STED显微成像技术与 $4\pi$ 显微镜结合,实现了三维超分辨率成像,得到了细胞内微管结构的图像, $x$ 、 $y$ 、 $z$ 三个方向的分辨率都达到50 nm. 2012年,Hell小组<sup>[64]</sup>利用固态浸没技术( $NA=2.2$ )与STED结合,实现了2.4 nm的横向分辨率.

2) 提高成像速度. 现有的超分辨率技术在提高分辨率的同时,也限制了成像速度. 如果在既能保证高分辨率的同时,又能实现实时快速成像,将对细胞通讯与细胞信号转导的分子机理研究,如神经回路连接成像等,具有重要的推动作用. STED技术和SIM技术都可应用于生物活细胞的快速实时成像,但是分辨率远低于固定样本成像,其时间分辨率也较低. 2011年,研究人员通过2个渥拉斯特棱镜,用4束损耗光同时扫描样品的STED方法,将成像速度提高了4倍,空间分辨率达到38 nm<sup>[65]</sup>.

3) 扩大视场. 突破衍射极限的远场成像方法普遍视场较小,如微球实现超衍射极限的方法,每个微球可以实现超衍射极限的目的,但是微球直径在亚毫米量级,导致视场受限. 如果将微球通过自组装有序排列,便可以有效扩大成像视场<sup>[55]</sup>.

### 4 结论

突破衍射极限的成像方法为生物科学和医学领域提供了高分辨率检测手段,已经成为光学信息提



取和处理技术中的研究热点. 本文详细介绍了通过非线性效应、特殊光照明、耦合元件和微球收集倏逝波的基本原理和成像方法,着重介绍了各种方法在生物成像领域的应用,分析了这些成像方法的特点,最后结合最新进展分析了突破衍射极限的远场成像技术的发展方向.

### 参考文献:

- [1] REIMER L. Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis[M]. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1998: 529.
- [2] YANG J, XU W. Scanned-cantilever atomic force microscope with large scanning range[J]. Chinese Optics Letters, 2006(10): 580-582.
- [3] BINNIG G, ROHRER H, GERBER Ch, et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy[J]. Physical Review Letters, 1982, 49: 56-60.
- [4] SYNGE E H. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region[J]. Philosophical Magazine, 1928, 6(35): 356-362.
- [5] MICHAELIS J, HETTICH C, MLYNEK J, et al. Optical microscopy using a single-molecule light source[J]. Nature, 2000, 405: 325-327.
- [6] 郑建亚, 于晓明, 张天浩, 等. 用扫描近场光学显微镜技术研究金膜表面等离子体共振[J]. 光学学报, 2006, 26(8): 1236-1239.  
ZHENG Jian-ya, YU Xiao-ming, ZHANG Tian-hao, et al. Research of surface plasmon resonance on goldfilm using scanning near-field optical microscopy[J]. Acta Optica Sinica, 2006, 26(8): 1236-1239. (in Chinese)
- [7] 刘诚, 闫长春, 高淑梅. 近场显微干涉成像中的探测角度和偏振问题研究[J]. 光学学报, 2006, 26(3): 425-429.  
LIU Cheng, YAN Chang-chun, GAO Shu-mei. Detection angle and polarization dependences of the interferometric imaging with near-field scanning microscopy[J]. Acta Optica Sinica, 2006, 26(3): 425-429. (in Chinese)
- [8] 徐铁军, 许吉英, 工佳, 等. 扫描近场光学显微镜探针与光场相互作用的分析[J]. 光学学报, 2005, 25(4): 465-469.  
XU Tie-jun, XU Ji-ying, WANG Jia, 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(4): 465-469. (in Chinese)
- [9] RAYLEIGH L. On the manufacture and theory of diffraction-gratings[J]. Philosophical Magazine, 1874, 47: 193.
- [10] 吕乃光. 傅里叶光学[M]. 2版. 北京: 机械工业出版社, 2006: 82-85.
- [11] 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.
- [12] KLAR T A, JAKOBS S, DYBA M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [13] WILLIG K I, RIZZOLI S O, WESTPHAL V, et al. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis[J]. Nature, 2006, 440(7086): 935-939.
- [14] RITTWEGER E, HAN K Y, IRVINE S E, et al. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution[J]. Nature Photonics, 2009, 3: 144-147.
- [15] HELL S W, KROUG M. Ground-state depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit[J]. Applied Physics B, 1995, 60: 495-497.
- [16] BRETSCHNEIDER S, EGDELING C, HELL S W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving[J]. Physical Review Letters, 2007, 98: 218103.
- [17] WURM C A, NEUMANN D, LAUTERBACH M A, et al. Nanoscale distribution of mitochondrial import receptor Tom20 is adjusted to cellular conditions and exhibits an inner-cellular gradient[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(33): 13546-13551.
- [18] MEYER L, WILDANGER D, MEDDA R, et al. Dual-color STED microscopy at 30 nm focal-plane resolution[J]. Small, 2008, 4(8): 1095-1100.
- [19] DONNERT G, KELLER J, WURM C A, et al. Two-color far-field fluorescence nanoscopy[J]. Biophysical Journal, 2007, 92(8): L67-L9.
- [20] BÜCKERS J, WILDANGER D, VICIDOMINI G, et al. Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses[J]. Optics Express, 2011, 19(4): 3130-3143.
- [21] CHEN Jian-fang, DENG Su-hui, WANG Fei, et al. Improved resolution in fluorescence microscopy with the FRET pairs by time gating[J]. Optics Express, 2015, 23: 13121-13129.
- [22] MONERON G, HELL S W. Two-photon excitation STED

- microscopy[J]. *Optics Express*, 2009, 17(17): 14567-14573.
- [23] GUSTAFSSON M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [24] GUSTAFSSON M G L. Doubling the lateral resolution of wide field fluorescence microscopy using structured illumination[J]. *SPIE*, 2000, 3919: 141-150.
- [25] GUSTAFSSON M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *Journal of Microscopy-oxford*, 2000, 198: 82-87.
- [26] HEINTZMANN R, CREMER C. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[J]. *SPIE*, 1998, 3568: 185-195.
- [27] FROHN J T, KNAPP H F, ATEMER A. True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination[J]. *PNAS*, 2000, 97(13): 7232-7236.
- [28] FROHN J T. Super-resolution fluorescence microscopy by structured light illumination[D]. Zurich: Swiss Federal Institute of Technology, 2000.
- [29] GUSTAFSSON M G L, SHAO L, CARITON P M, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(12): 4957-4970.
- [30] SCHERMELLEH L, CARITON P M, HAASE S, et al. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy[J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1332-1336.
- [31] SHAO L, ISAAC B, UZAWA S, et al.  $I^3M$ : wide-field light microscopy with 100-nm-scale resolution in three dimensions[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(12): 4971-4983.
- [32] DAN D, LEI M, YAO B, et al. DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1116): 1-7.
- [33] FITZGIBBON J, BELL K, KING E, et al. Super-resolution imaging of plasmodesmata using three-dimensional structured illumination microscopy[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1453-1463.
- [34] RAHMAN M, ABD-EL-BARR M, MACK V, et al. Optical imaging of cervical pre-cancers with structured illumination: an integrated approach[J]. *Gynecologic Oncology*, 2005, 99(3): S112-S115.
- [35] BEST G, AMBERGER R, BADDELEY D, et al. Structured illumination microscopy of auto-fluorescent aggregations in human tissue[J]. *Micron*, 2011, 42(4): 330-335.
- [36] ZHOU X, LEI M, DAN D, et al. Double-exposure optical sectioning structured illumination microscopy based on hilbert transform reconstruction[J]. *Plos One*, 2015, 10(3): e0120892.
- [37] NOVOTNY L, HECHT B. Principles of nano-optics[M]. New York: Cambridge University Press, 2006.
- [38] TOKUNAGA M, IMAMOTO N, SAKATA-SOGAWA K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells[J]. *Nat Meth*, 2008, 5(2): 159-161.
- [39] TONG Li-min, GATTASS R R, ASHCOM J B, et al. Subwavelength-diameter silica wires for low-loss optical wave guiding[J]. *Nature*, 2003, 426(6968): 816.
- [40] HAO Xiang, LIU Xu, KUANG Cui-fang, et al. Far-field super-resolution imaging using near-field illumination by micro-fiber[J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 102: 013104.
- [41] HAO Xiang, KUANG Cui-fang, LI Yang-hui, et al. Evanescent-wave-induced frequency shift for optical super resolution imaging[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(14): 2455-2458.
- [42] FANG N, LEE H, SUN C. Sub-diffraction-limited optical imaging with a silver superlens[J]. *Science*, 2005, 308: 534-536.
- [43] LEE H, LIU Z, XIONG Y, et al. Design, fabrication and characterization of a far-field superlens[J]. *Solid State Communications*, 2008, 146(5/6): 202-207.
- [44] LIU Z, DURANT S, LEE H, et al. Far-field optical superlens[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(2): 403-408.
- [45] DURANT S, LIU Z, FANG N, et al. Theory of optical imaging beyond the diffraction limit with a far-field superlens[J]. *Metallic Nanostructures and Optical Properties*, 2006, 6323: H3231-H3231.
- [46] XIONG Y, LIU Z, SUN C, et al. Two-dimensional imaging by far-field superlens at visible wavelengths[J]. *Nano Letter*, 2007, 7(11): 3360-3365.
- [47] ZHANG X, LIU Z. Superlenses to overcome the diffraction limit[J]. *Nature Materials*, 2008, 7(6): 435-441.
- [48] SMOLYANINOV I I, HUNG Y, DAVIS C C. Magnifying superlens in the visible frequency range[J]. *Science*, 2006, 315(5819): 1699-1701.
- [49] MELVILLE D O, BLAIKIE R J, ALKAISI M M. A comparison of near-field lithography and planar lens litho-

- graphy[J]. *Current Applied Physics*, 2006, 6(3): 415-418.
- [50] CAO P F, ZHANG X, CHENG L, et al. Far field imaging research based on multilayer positive-and negative-refractive-index media under off-axis illumination [J]. *Progress in Electromagnetics Research*, 2009, 98: 283-298.
- [51] JACOB Z, ALEKSEYEV L V, NARIMANOV E. Optical hyperlens: far-field imaging beyond the diffraction limit [J]. *Optics Express*, 2006, 14(18): 8247-8256.
- [52] LIU Z, LEE H, XIONG Y, et al. Far-field optical hyperlens magnifying sub-diffraction objects [J]. *Science*, 2007, 315: 1686.
- [53] LEE H, LIU Z, XIONG Y, et al. Development of optical hyperlens for imaging below the diffraction limit [J]. *Optics Express*, 2007, 15(24): 15886-15891.
- [54] CHENG L, CAO P, MENG Q, et al. Semi-cylindrical hyperlens made of Al/MgO for 20nm lithography node [J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 179-180: 1047-1052.
- [55] WANG Zeng-bo, GUO Wei, LI Lin, et al. Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope[J]. *Nature Communications*, 2010, 2: 2184.
- [56] DARAFSHEH A, LIMBEROPOULOS N I, DEROV J S, et al. Advantages of microsphere-assisted super-resolution imaging technique over solid immersion lens and confocal microscopies[J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 104: 061117.
- [57] HAO X, KUANG C, LI Y, et al. Hydrophilic microsphere based mesoscopic-lens microscope [J]. *Optics Communications*, 2012, 285: 4130-4133.
- [58] HAO Xiang, KUANG Cui-fang, LIU Xu, et al. Microsphere based microscope with optical super-resolution capability[J]. *Applied Physics Letters*, 2011, 99: 203102.
- [59] 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: 141128.
- [60] LEE S, LI L. Rapid super-resolution imaging of sub-surface nanostructures beyond diffraction limit by high refractive index microsphere optical nanoscopy [J]. *Optics Communications*, 2015, 334: 253-257.
- [61] LI L, GUO W, YAN Y, et al. Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy [J]. *Light: Science & Applications*, 2013, 2: e104.
- [62] DARAFSHEH A, GUARDIOLA C, PALOVCAK A, et al. Optical super-resolution imaging by high-index microspheres embedded in elastomers [J]. *Optics Letters*, 2015, 40(1): 5-8.
- [63] DYBA M, JAKOBS S, HELL S W. Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21 (11): 1303-1304.
- [64] WILDANGER D, PATTON B R, SCHILL H, et al. Solid immersion facilitates fluorescence microscopy with nanometer resolution and sub-angstrom emitter localization [J]. *Adv Mater*, 2012, 24(44): 309-313.
- [65] BINGEN P, REUSS M, ENGELHARDT J, et al. Parallelized STED fluorescence nanoscopy [J]. *Optics Express*, 2011, 19(24): 23716-23726.

(责任编辑 杨开英)