

15

## Сканирование оптического ближнего поля микрочастицами, взвешенными в иммерсионной жидкости

© Ю.В. Микляев, С.А. Ассельборн, А.М. Герасимов

Вузовско-академический отдел нелинейной оптики Института электрофизики УрО РАН и Южно-Уральского государственного университета, Челябинск  
E-mail: mikliaevyv@susu.ac.ru

Поступило в Редакцию 13 марта 2014 г.

Предложен и экспериментально продемонстрирован новый способ получения изображения с разрешением, превышающим дифракционный предел микроскопа. При помощи регистрации картины свободного движения микрочастиц над поверхностью образца и анализа интенсивности света, рассеиваемого частицами, удалось повысить предельное разрешение используемого микроскопа в 3 раза.

Известно, что классический предел разрешения идеальной оптической системы определяется дифракционным размером пятна как

$$R = \lambda / (2NA),$$

где  $R$  — размер пятна,  $\lambda$  — длина волны используемого света,  $NA$  — числовая апертура объектива. Этот предел задается волновой природой света и рассматривается как непреодолимое препятствие для многих практических случаев. Тем не менее этот предел разрешения определен при некоторых ограничивающих предположениях, таких как монохроматичность источника, неполяризованный свет, неподвижное изображение и т.д. Во многих случаях при устранении этих ограничений могут быть получены дополнительные степени свободы, которые позволяют преодолеть данный предел.

Временная степень свободы является одной из наиболее привлекательных. В этом случае статический объект наблюдается при изменяющихся во времени условиях. Повышение разрешающей способности достигается за счет учета этих условий и при совместной

обработке набора изображений, полученных в этих условиях. Например, в работе [1] представлен метод, в котором наблюдаемый образец освещается перемещающейся спекл-картиной известной формы, что позволяет при помощи цифровой обработки накопленных данных получить изображение повышенного разрешения. Недостатком данного метода является необходимость предварительного получения информации о распределении интенсивности используемой спекл-картины с высокой точностью.

В работе [2] предлагается использовать наноструктурированную рассеивающую среду, на которую наносится образец. В этом случае также требуется изменяющееся во времени освещение образца. Сбор получаемых при этом изображений, их анализ и обработка приводят к повышению разрешения.

Наиболее эффективно проблема получения сверхразрешения решена в люминесцентной микроскопии. В работах [3–5] предложен метод, основанный на таком возбуждении люминесценции, при котором излучение происходит единичными молекулами красителя, среднее расстояние между которыми превосходит разрешение оптического микроскопа. За счет накопления информации по многим актам излучения и локализации молекул с высокой точностью получают картину плотности распределения красителя с высоким разрешением.

Другая возможность получить больше информации об образце — это разделение информации, получаемой при освещении излучением различных длин волн. В этом случае объект не должен иметь окраску, т. е. не должен выглядеть по-разному для разных длин волн [6]. Также существуют методы, при которых используются ортогональные поляризации света для увеличения разрешения в случае поляризационно-симметричного образца [7]. В некоторых случаях возможно повышение разрешения благодаря применению математической обработки изображения, заключающейся в экстраполяции пространственного спектра [8]. Недостатками этих методов являются их применимость только к определенным типам исследуемых образцов, а также незначительное (не многократное) повышение разрешающей способности.

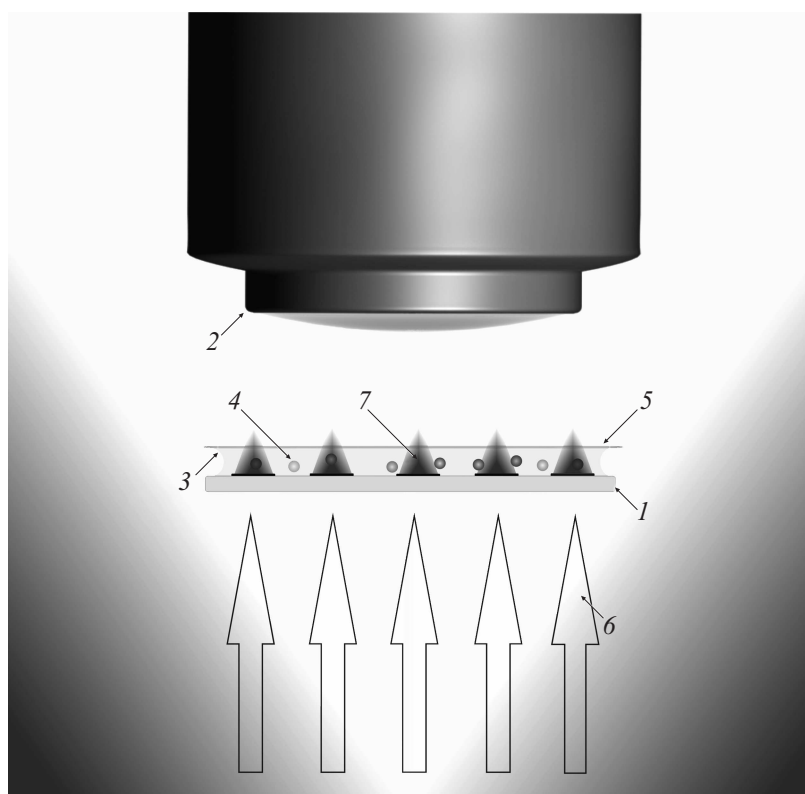
Сканирующие методы микроскопии также можно рассматривать как использующие временную степень свободы, что, например, широко применяется в сканирующей ближнепольной оптической микроскопии (СБОМ). Сложность использования СБОМ состоит в том, что расстояние от зонда до поверхности образца должно быть сопоставимо

с получаемым разрешением. В работе [9] предлагается использовать сочетание сканирующего зондового микроскопа с люминесцирующей молекулой на конце зонда и обычного оптического микроскопа. Такое сочетание дает возможность при помощи зонда создать „точечный“ источник света, который освещает „точку“ поверхности образца, а при помощи обычного микроскопа — наблюдать свет, рассеянный данной точкой. Но существует и другой вариант — не освещение, а затенение точки поверхности, и наблюдение обычным микроскопом изменения картины отраженного света [10]. Посредством этого сочетания можно поднять скорость получения изображения с повышенным разрешением, сканируя только необходимые участки поверхности. Представленные методы сочетания микроскопов наследуют недостатки зондовой микроскопии, такие как высокая стоимость, связанная с дорогостоящей системой точного позиционирования зонда, и все еще низкая скорость получения изображения.

В данной работе предложен и экспериментально продемонстрирован метод, позволяющий устранить недостатки СБОМ, связанные с применением системы нанопозиционирования зонда. В качестве зондов, сканирующих ближнее поле, здесь предлагается использовать свободно перемещающиеся в жидкости микро- или наночастицы. Частицы могут быть рассеивающие, люминесцирующие (точечные источники света) или поглощающие (метод затеняющего „зонда“), как взвешенные в тонком слое жидкости, наносимом на поверхность исследуемого объекта под покровное стекло, так и добавленные в иммерсионную жидкость. Основные положения данного метода были защищены нами в патенте [11].

Рис. 1 схематически иллюстрирует принцип получения изображения повышенного разрешения в случае освещения образца проходящим светом. Образец представляет собой амплитудную периодическую решетку и используются рассеивающие частицы в прозрачной жидкости. На получаемом в такой схеме изображении образца частицы имеют малую светимость, если находятся в области ближнего поля над поглощающим элементом образца (в области отбрасываемой им тени) и „вспыхивают“ при выходе из области тени.

Известно, что координату точечного источника (излучателя, рассеивателя или поглощающего центра) можно определить с помощью обычного оптического микроскопа гораздо точнее, чем его разрешающая способность [12,13]. Таким образом, получать точную ин-



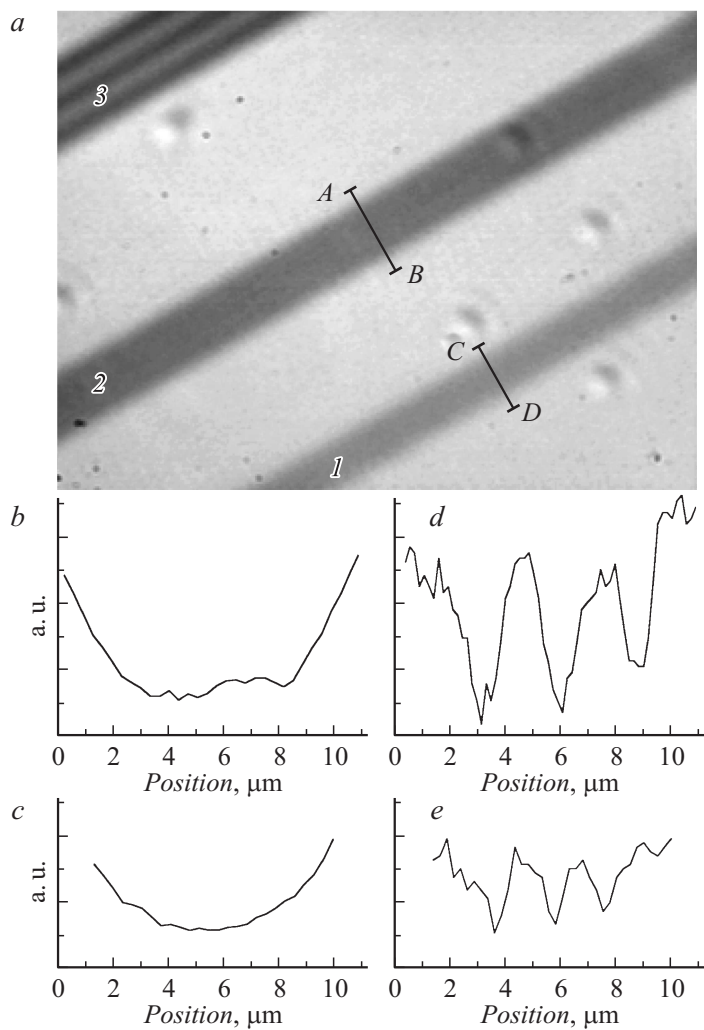
**Рис. 1.** Схема получения изображения за счет сканирования частицами: 1 — образец, 2 — объектив микроскопа, 3 — суспензия микрочастиц, 4 — микрочастицы, 5 — покровное стекло, 6 — освещение образца, 7 — области тени в ближнем поле объекта.

формацию о координате зонда (в нашем случае отдельной частицы) можно, рассматривая образец с нанесенной на поверхность суспензией частиц в оптический микроскоп. Те частицы, которые оказываются в непосредственной близости от поверхности образца (в области ближнего поля), передают информацию о значении интенсивности в данной точке ближнего поля. Эванесцентное излучение в результате

дифракции на частицах превращается в распространяющееся излучение, которое регистрируется обычным оптическим микроскопом дальнего поля. Использование цифровой камеры микроскопа позволяет собирать информацию о латеральных координатах перемещающихся частиц и интенсивности рассеиваемого ими света на протяжении множества отдельных кадров видеоряда. Обработывая эти кадры, можно в реальном масштабе времени восстанавливать информацию о распределении ближнего поля на поверхности образца. При этом заметим, что нет необходимости определять, находится ли в данный момент частица в области ближнего поля или нет. В процессе регистрации можно учитывать светимость всех частиц. Вклад в изображение, полученный от частиц, находившихся в момент регистрации высоко над поверхностью образца и не способных дать высокое разрешение, можно затем дискриминировать, применив фильтрацию итогового изображения с ослаблением низких пространственных частот.

Вычисляя координаты частиц в произвольные моменты времени, можно „отсканировать“ частицами всю поверхность в пределах поля зрения оптического микроскопа. Поскольку при этом можно наблюдать одновременно большое количество частиц, то скорость такого „сканирования“ существенно выше, чем у ближнепольного микроскопа, и будет линейно зависеть от частоты кадров используемой камеры.

Экспериментальная реализация предлагаемого метода проводилась следующим образом (рис. 1). Образец помещался под объектив микроскопа. На образец наносилась капля суспензии, содержащая взвесь латексных микрочастиц размером  $1.5 \mu\text{m}$ . Для того чтобы сделать поверхность жидкости плоской, на каплю как можно ближе к поверхности образца помещалось покровное стекло. Плоская поверхность жидкости вместе с покровным стеклом позволяла избежать возможных искажений при наблюдении поверхности образца через микроскоп. Следует заметить, что доля „полезных“ частиц, находящихся в непосредственной близости к поверхности образца (в области ближнего поля), напрямую зависит от толщины слоя жидкости, заключенной между образцом и покровным стеклом. Далее объектив микроскопа с  $NA = 0.2$  подводится к образцу на расстояние, дающее резкое изображение поверхности образца. Наблюдение производилось в проходящем свете. Образец освещался через конденсор светом галогеновой лампы накаливания. Свет лампы проходил через красный светофильтр КС-18 с граничной полосой пропускания на длине волны  $\lambda = 700 \text{ nm}$  и максимумом пропускания на



**Рис. 2.** Изображение тестового объекта и его анализ; *a* — изображение образца с частицами, получаемое камерой микроскопа; *b, c* — распределение интенсивности вдоль отрезков *AB* и *CD*, показанных на рис. 2, *a*; *d, e* — графики зависимости яркости микрочастицы от ее координаты, полученные при ее движении вдоль отрезков *AB* и *CD*.

$\lambda = 850 \text{ nm}$ . Теоретическое разрешение микроскопа по критерию Релея, таким образом, составляло  $2.6 \mu\text{m}$ . Посредством цифровой камеры производилась регистрация и запись набора изображений (видеоряда) образца, соответствующих различным распределениям частиц над его поверхностью. В каждом кадре видеоряда определялись величина рассеяния света отдельной частицей и координата этой частицы. На получаемом изображении повышенной четкости пикселю, в который попадала координата каждой частицы, ставилось в соответствие значение интенсивности рассеиваемого ею света.

На рис. 2 представлены полученное экспериментально изображение образца, а также сечения этого изображения. В качестве образца использовалась амплитудная маска с 3 группами чередующихся металлических полос на стекле. В каждой группе по 3 полосы, расстояние между полосами и ширина полос составляли  $1.6$  и  $0.4 \mu\text{m}$  для первой группы,  $2.1$  и  $0.7 \mu\text{m}$  для второй группы,  $3$  и  $1 \mu\text{m}$  для третьей группы. По сечению распределения интенсивности (рис. 2, *b* и *c*) вдоль отрезков *AB* и *CD*, показанных на рис. 2, *a*, видно, что используемый в эксперименте микроскоп не разрешает полосы первой ( $1.6 \mu\text{m}$ ) и второй ( $2.1 \mu\text{m}$ ) групп. Частицы же, пересекающие при перемещении эти полосы, меняли свою светимость. В ходе эксперимента были выбраны частицы, которые перемещались вдоль отрезков *AB* и *CD*. На рис. 2, *d* и *e* показана зависимость интенсивности свечения этих частиц от их положения на отрезках. Как видно из рис. 2, *d* и *e*, сканирование образца микрочастицами позволило повысить разрешающую способность полученного изображения до  $800 \text{ nm}$ , что более чем в 3 раза превышает разрешение используемого микроскопа.

Таким образом, в данной работе впервые предложен и экспериментально продемонстрирован новый метод повышения разрешающей способности оптического микроскопа. Получено разрешение, превосходящее разрешение используемого микроскопа более чем в 3 раза. Разрешение данного метода ограничено только размерами частиц, которые могут регистрироваться оптическим микроскопом (до  $10 \text{ nm}$ ). В настоящее время ведется работа над получением изображения при помощи наночастиц размером  $50 \text{ nm}$ .

Данное исследование выполнено при частичной поддержке ФГБУ „Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере“ по программе „УМНИК“ в 2013–2014 г.

## Список литературы

- [1] *Garcia J., Zalevsky Z., Fixler D.* // Optics Express. 2005. V. 13. N 16. P. 6073–6078.
- [2] *van Putten E.G., Akbulut D., Bertolotti J., Vos W.L., Lagendijk A., Mosk A.P.* // Phys. Rev. Lett. 2011. V. 106. P. 193905.
- [3] *Klimov A.A., Klimov D.A., Klimova T.V.* // U.S. Patent. 2005. 7.803.634; Russian patent. 2005. 2.305.270.
- [4] *Hess S.T., Girirajan N.P., Mason M.D.* // Biophys. J. 2006. V. 91. P. 4258–4272.
- [5] *Jones S., Shim S., Zhuang X.* // Nature Methods. 2011. V. 8. (6). P. 499–508.
- [6] *Tai A.M.* // Appl. Opt. 1983. V. 22. Iss. 23. P. 3826–3832.
- [7] *Lohmann A.W., Paris D.P.* // Appl. Opt. 1964. V. 3. Iss. 9. P. 1037–1043.
- [8] *Dekker A.J., van den Bos A.* // J. Opt. Soc. Am. A. 1997. V. 14. Iss. 3. P. 547–557.
- [9] *Michaelis J., Hettich C., Mlynek J., Sandoghdar V.* // Nature. 2000. V. 405. P. 325–328.
- [10] *Lewis A., Taha H., Strinkovski A., Manevitch A., Khatchatourians A., Dekhter R., Ammann E.* // Nature Biotechnology. 2003. V. 21. P. 1378–1386.
- [11] *Mikliaev Yu.V., Asselborn S.A.* // European Patent. 2006. 2.012.109; U.S. Patent. 2006. 20.090.116.024.
- [12] *Rogers S.S., Waigh T.A., Zhao X.B., Lu J.R.* // Phys. Biol. 2007. V. 4. P. 220–227.
- [13] *Weisenburger S., Jing B., Renn A., Sandoghdar V.* // Proc. SPIE. San Diego, California, United States, 2013. V. 8815.88150D.