

探索更高分辨本领的成像技术¹⁾

——兼评《扫描近场光学显微镜与纳米光学测量》

朱星[†]

(北京大学物理学院 北京 100871)

2016-08-01收到

† email: zhuxing@pku.edu.cn

DOI: 10.7693/wl20170511

视觉是人类感知外部客观世界的重要方式。我们常说“眼见为实”，说明人们通过图形图像识别而理解世界本质的重要性。从天文望远镜到电子显微镜，人们的视野从遥远的宇宙延伸到单个分子、原子。由于当代光学、电子学的快速发展，尤其是激光、超灵敏度的光电转换器件、计算机控制及图像处理的快速发展，人们曾经梦寐以求的极远或者极小物体的成像已经成为现实。在诸多的成像技术中，光学显微由于其放大倍数可以覆盖几倍至上千倍，可以直接被人眼接收并成像，易于操作，便于进行偏振、反射、吸收等研究的特点，已经成为常规显微的主要方法之一。然而，随着科学技术向微观世界发展，微电子、微光电器件、纳米材料研究

的重点急需观察亚微米、纳米、亚纳米尺度的结构和性能，生命科学也提出对于细胞内部结构的亚单元、染色体甚至DNA观察的需求。这些需求推动了新一代亚微米至纳米成像技术的发展。

自从16世纪末Zacharias Jansen发明的第一台显微镜到当代高度发展的显微技术，光学显微技术经历了长期的发展过程。通过采用不同的成像衬度原理，光学显微镜已经成为物理、化学、生物、医学，以及材料科学等研究中必不可少的工具。很难再找到比光学显微镜应用更加广泛，使用更加方便的其他方法。人们梦寐以求的是不断提高光学分辨本领，以观察更加细微的物质结构。

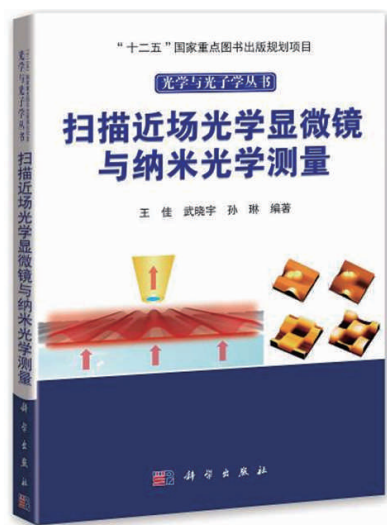
19世纪末期，德国科学家Ernst Abbe和英国Raleigh爵士引入了光的空间分辨率衍射极限的概念(the diffraction limit of spatial resolution)。由于光所具有的波动性，使得光的聚焦或成像必须服从这个基本的物理定律，即，光学显微镜不能分辨相距小于探测光波长约一半的物体。例如，当使用常用可见光的波长为500 nm时，空间分辨率被限制为250 nm左右。因此，数百年来，虽然科学家从成像镜头形状设计、消除像差、色散等方面做出各种技术改进，包括采用激光共焦显

微镜(laser scanning confocal microscopy)，都不能从本质上实现突破衍射极限的高分辨光学成像。

上世纪80年代是国际上超高分辨率显微技术发明的大爆发时期。获得1986年诺贝尔物理学奖的扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscopy, STM)成为其中的代表。利用STM，人们可以直接观测位于物体表面的单个原子。

与两位获奖人Heinrich Rohrer、Gerd Binnig同在瑞士IBM Ruschlikon实验室的Dieter Pohl没有和他的同事从事电子的量子隧穿效应研究，而是从提高光学分辨率的角度，独辟蹊径地利用了光子的隧穿效应，研制成功了扫描近场光学显微镜(scanning near-field optical microscopy, SNOM)，这种技术的核心是将极小的光学探针放置在距离样品不到一个波长的极近距离，即光学近场区域(optical near-field)进行探测。

这种近场显微术概念最早是1928年由都柏林(Dublin)的教授Edward Hutchinson Syngé爵士提出的。1928年5月25日他提出一个划时代的设想²⁾。他向*Philosophical Magazine*提交《一种将显微镜分辨率提高到超显微范围的方法》(A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region)，为如何提高



1) 本文为王佳等编著《扫描近场光学显微镜与纳米光学测量》一书的序言。

2) Syngé E. H., A Suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region, *Phil. Mag.*, 6 (1928) 356-362

显微镜的分辨率提出一种方法学的新建议。为了提高光学分辨率,当时公认的提高分辨率的方法是使用更短波长的光源。但是从实际应用的角度,很难将光学显微镜的分辨率提高到0.1 nm以上。因此,在一位著名物理学家的建议下, Synge提出了一种不同于常规显微方法的极其简单的概念性方案,有可能将光学分辨率提高到10 nm。将一束光从下面照射直径为10 nm的孔,该孔保持与样品距离为10 nm,在平面内以10 nm步长运动,透过这个孔的光线通过样品后的投射强度被记录下来,从而得到远优于衍射极限的高分辨率。由于当时的微加工、微移动和微光源探测技术远远未得到发展,这个新概念受到科学界的质疑,包括爱因斯坦都写文章说:“这个方法从原理上是不可行的!”

然而,50多年后,以Dieter Pohl、Aaron Lewis、Eric Betzig为代表的科学家通过不懈努力,终于实现了优于光学衍射极限1—2个数量级的高分辨成像。SNOM成为一种与常规光学显微镜完全不同的新技术。这项技术的核心问题是对样品表面隐失场的探测,涉及到精密的微纳加工、高速可靠的亚纳米扫描,以及极其微弱光信号的高速采集,从原理到技术应用都是多学科高度交叉的领域。

为此,国际上形成一个专门研究在近场条件下光学现象和高分辨成像的领域: near-field optics,并且每两年轮流在美洲、欧洲、亚洲召开一次国际研讨会NFO (international conference on near-field optics and related techniques)。我和《扫描近场光学显微镜与纳米光学测量》一书的作者王佳教授是国内较早加入

这个国际团队的成员。王佳教授多次参加NFO国际会议,积累了丰富的经验,也结识了一大批国际著名学者。2010年,我与王佳教授有幸作为共同主席,主持了在北京召开的第11届国际近场光学会议(NFO-11),这是NFO系列会议中规模最大的一次。

人们探索更高分辨本领成像技术的步伐一直没有停止。由于SNOM在纳米探针制备方法、提高探测光通量和扫描速度等方面存在难以克服的困难,特别是难以应用于活体、柔软的生命分子样品的高分辨成像,科学家将眼光转向了其他的方法。

2014年诺贝尔奖委员会出人意料地将化学奖授予3位物理学家,以表彰他们用超分辨荧光显微镜观测生物分子的成就: Eric Betzig、Stefan W. Hell和W. E. Moerner。其中Betzig在SNOM领域中最重要的是发展了一种制备金属膜覆盖的纳米光学探针方法,并且在室温与极低温下对单个分子的成像与光谱的高分辨成像。这是一个非常令人深思的范例。一位诺贝尔奖获得者不是因为他成名的学术贡献(SNOM),而是他运用这些长期积累的交叉学科技术和方法,实现了超高分辨的分子荧光成像。这说明仅仅掌握关键核心技术还不够,必须与当今学术界最关心的研究对象结合才能取得如此成就。

生命科学追求的是在小分子尺度对单个活体细胞的动态成像,多年来进展甚微。而2014年的诺贝尔化学奖获得者不是对分子进行直接成像,而是通过荧光分子间接地获得超分辨成像。

Betzig获奖的超分辨率显微镜叫光激活定位显微镜(photoactivated

localization microscopy, PALM),利用W. E. Moerner发现的光激活方法。他用微量激光照射样品,使其中极小部分荧光分子发出荧光。由于这些荧光分子相距远,可以获得超分辨的分子定位。Stefan Hell发明的是受激发射损耗荧光成像显微镜(stimulated emission depletion, STED)技术。用脉冲激发微米区域所有荧光分子,用环形圈状的激光,使其照射区域的所有分子的荧光淬灭(depletion),只留下中间纳米尺度分子的荧光而得到超高分辨率。另一种超分辨率显微镜(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)与PALM原理也基本一致,用于不同的受激体系。

从Betzig成功的例子还可以看出,没有掌握最基本的理论基础和实验技能是不可能真正创新。王佳教授团队编著的《扫描近场光学显微镜与纳米光学测量》正是为读者提供了纳米光学中最基本的物理学知识,光学工程的实践和必要的微纳系统的机械—光学—电子—数据处理一体化的必要内容,为有志于从事纳米光学和纳米显微学的青年学者和研究生提供必要的基础和大量供参考的资料。

前述的SNOM领域的先行者、诺贝尔奖获得者Betzig是一位不安分守己的创新者。这是一个典型的物理学家由于解决生物问题而获得化学奖的范例。据说他获奖后,觉得这个技术不再吸引他,便又转移到“选择性光片照明显微镜”的创新中。我期望本书的读者在仔细阅读丰富内容的同时,激活大脑中的活跃细胞。若干年后,或许会出现像Betzig那样的不安分守己的创新者?也未可知。

是为序。