

双光子技术的应用研究进展*

汪 国 平

(武汉大学物理系 武汉 430072)

摘 要 双光子技术在未来光电子集成、生物分子探测、医学诊断等领域具有巨大应用潜力和广阔应用前景。文章着重介绍了双光子过程在荧光显微成像、高密度数据存储以及微细加工等领域的应用研究进展。对影响双光子技术的应用和发展的相关领域的研究动态也进行了简要讨论。

关键词 双光子激发, 显微术, 数据存储, 微细加工

PROGRESS IN THE APPLICATION OF TWO-PHOTON EXCITATION

WANG Guo Ping

(Department of Physics, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Two-photon excitation provides potential applications in optoelectronic integration, the detection of single biomolecules, and medical diagnosis. Progress in two-photon excitation based fluorescent microscopy, high density data memories, and microfabrication is reviewed. Related fields that may have significant influence on the applications of these techniques are also discussed briefly.

Key words two-photon excitation, microscopy, data memory, microfabrication

1 引言

双光子过程以其特有的三维处理能力和极高的空间分辨本领而在生物、物理、化学、医学、微电子技术等广泛领域显示出变革性的应用潜力。目前,双光子技术应用于高密度数据存储、单分子检测、医疗诊断以及三维微细加工等领域的研究,已成为光学及其交叉学科中最诱人、最活跃的研究领域之一。近十年来,美、日、德等发达国家对双光子技术在广泛领域的应用研究已经取得了突飞猛进的发展,部分成果已进入实用化阶段。我国许多高等学校及研究所也已相继开展这方面的研究工作,以跟踪国际前沿,缩小差距。本文着重对双光子过程在光通信、光电集成、生物医学等领域的关键技术上的应用,如高密度数据存储、荧光显微成像以及微细加工等领域的研究进展进行介绍。同时对严重影响该技术的应用和发展的相关领域的研究动态、存在的主要问题也进行了简要评述。

2 双光子过程的激发

一般来讲,物质分子一次只能吸收具有使分子从基态跃迁到激发态的能量的一个光子。但是,如果

光强足够高,便会产生多光子吸收,即一次吸收多个光子。所谓双光子过程,就是材料分子一次吸收两个光子。每个光子的能量只有该分子的基态和激发态的能量之差的一半左右。要产生双光子吸收,激发光场必须具有足够高的光子密度。为此,通常使用聚焦光束,通过显微物镜使其在焦点处产生足够强的光密度。由于只有焦点附近的光强达到产生双光子吸收的密度条件,因此,光化学过程只局限在焦点附近极小的空间内,导致空间分辨本领的提高。

正是由于双光子过程的空间选择性和高分辨能力,可在三维空间内任意局域化的区域产生,因而具有广阔应用前景。

3 双光子过程的应用

3.1 双光子荧光显微术

和通常的荧光显微术相比较,双光子荧光显微术具有以下特点:(1)只有焦点处汇集足以产生双光子吸收的光强度,因而可获得高的分辨率;(2)焦点以外不发生荧光漂白现象;(3)用比生物材料的本征吸收波长长一倍、对样品透明的近红外光照明,可透视样品的三维像;(4)由于瑞利散射产生的背景噪声

* 2000 - 02 - 22 收到初稿,2000 - 03 - 21 修回

只有单光子荧光时的 $1/16$, 图像对比度高; (5) 激发光和信号光波长的差别显著, 易于滤波探测; (6) 用可见光区的光学元件, 可获得紫外光区的衍射极限分辨率, 降低了光学元件在紫外区的色散. 因此, 自 1990 年美国 Cornell 大学的 Denk 等人^[1]首次结合双光子过程和扫描共焦显微成像系统^[2]获得生物样品体内的荧光像以来, 双光子荧光显微成像术在物理、化学、生物、医学等广泛领域受到极大关注, 并获得迅猛发展. Denk 等人所用的光学系统的原理如图 1 所示. 它主要包含一套 $4F$ 扫描系统. 尽管他们所用的激光波长为 630nm , 但获得的猪肾细胞分裂期的染色体的荧光像的分辨率却达 200nm 左右(如图 2). 超过瑞利衍射受限的极限分辨率(约

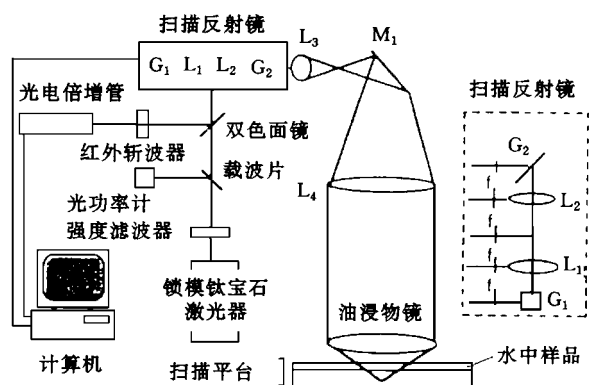


图 1 双光子荧光显微装置

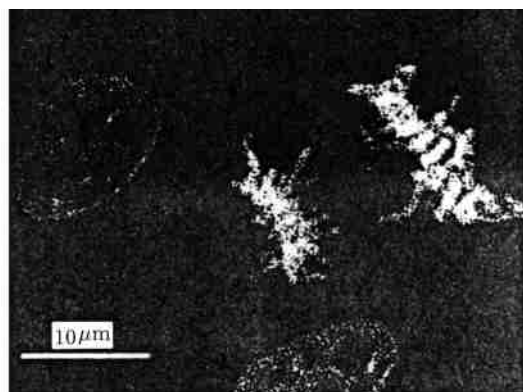


图 2 猪肾细胞的双光子荧光像

320nm). 如何进一步提高双光子成像技术的空间分辨率、成像速度和探测深度等, 构成当今该领域研究的主流. 德国 Max - Plank 研究所的 Hell 等人通过对普通共焦显微系统获得的三维图像解卷积, 首先在理论上证明^[3], 双光子共焦显微系统的空间分辨率可达到激发波长的 $1/3 - 1/4$. 后又结合由他们自己提出的 4π 共焦显微系统, 在实验上使双光子成像技术的空间分辨率达到 100nm 以下^[4]. 这个分辨率是其他任何远场成像技术都难以达到的. 该技术主

要使用了两个相对放置的物镜——这是光学显微镜中为提高分辨率而常为人们所用的一种结构方式. 另一方面, 为提高成像速度, Hell 等提出具有多聚焦点的多光子显微镜系统即 MMM 系统^[5]. 这样, 就可同时探测多个样品. 为提高透视深度, 日本 Osaka 大学的 Kawata 等提出能量调节补偿法^[6], 即在探测样品不同深度时, 改变激发光能量, 以降低散射, 提高图像对比度. 他们获得了生物样品表层 $250\mu\text{m}$ 以下的清晰荧光像, 并提出通过表面等离子体共振效应(SPR)增强荧光强度的方法^[7]. 此外, 用 CW 红外和近红外激光产生双光子吸收的荧光显微成像技术^[8]也是该领域有重要应用价值的研究课题.

尽管远场共焦探测技术获得了低于 100nm 的空间分辨率, 但要获得更高的空间分辨率, 使其适用于更具挑战性的研究领域, 如研究单分子动力学过程等, 则必须结合近场成像技术^[9]. 美国 Pacific Northwest 国家实验室的谢晓亮(X. S. Xie, 现在 Harvard 大学)等, 首次将扫描近场光学显微术(SNOM)和双光子荧光检测技术相结合, 用于研究单分子动力学. 他们的具有里程碑意义的工作是, 用无孔探针 SNOM 得到生物细胞膜的荧光像, 分辨率达到 20nm ^[10]. 可以说, 双光子 SNOM 技术是当今显微术及其应用中最热门的研究领域之一.

在双光子显微术以及以下两方面的应用研究中, 设备和配套元器件等的研制和开发也起着极其重要的作用. 激光器一般需要飞秒级超短脉冲激光器. 目前广泛使用的是钛宝石激光器. 波长在 $700 - 900\text{nm}$ 之间可调, 重复频率为 80MHz , 脉宽 $100 - 150\text{fs}$, 平均功率 $100\text{mW} - 1\text{W}$. 为减小体积, 使用方便, 提高平均输出功率, 以便提高扫描成像速度等, 目前改进型的锁模钛宝石激光器的脉宽已可达 12fs . 已开始投入生产的还有结构紧凑的掺铒光纤激光器. 其输出波长为 775nm , 重复频率 37MHz , 脉宽 100fs , 平均功率 5mW . 正在开发中的有使用寿命长、性能更稳定的半导体激光器等. 除激光器外, 具有自动校准可调聚焦深度的 ZOOM 型显微物镜、双色平面镜、光谱滤波器以及合适的荧光染料等的研究也是具有重要意义研究课题.

3.2 三维光学数据存储

尽管平面二维存储目前达到能够在直径 12cm 的 DVD 光盘上记录约 2h 的电影. 但随着信息技术的迅速发展, 需要进一步提高存储密度和容量. 通常的二维存储受衍射的限制, 不可能满足未来技术发展的要求. 解决的办法有二维近场存储和三维光学

存储方式.但与目前微电子领域业已广泛实用的近场磁光存储相比,近场光学存储并不具备太强的优越性.在三维体存储中,目前主要有两类方法:其一为体全息存储法;其二为比特存储法.前者本质上存储的是模拟信号,后者则为纯数字式存储.本文只对后者的研究进展作介绍.

与近场存储相比,三维光学存储技术具有随机存取、遥感操作、信息在记录介质内部而不是在表面、不易受损等优点.在三维光学存储技术中,最重要的问题在于记录和读取过程中的擦除现象.双光子技术则可以克服这一缺点,因而成为高密度光学数据存储中的重要技术之一.自1989年California大学Irvine分校的Rentzepis等^[11]用双光子技术在光致变色材料上记录成功只写一次的三维数据以来,美、日等国的科学家对此进行了广泛深入的研究.由于Rentzepis等人使用的是双波长双光束产生双光子的过程,因此,层内比特间距和层间距离分别高达 $30\mu\text{m}$ 和 $80\mu\text{m}$.1991年,Cornell大学的Webb等^[12]改用单波长单光束产生双光子的方法,在光致聚合物上成功地记录了10层,使层内比特间距和层间距离分别降到 $1\mu\text{m}$ 和 $3\mu\text{m}$.1995年,Kawata等^[13]用同样的方法在光致聚合物上记录30层获得成功.1997年,Rentzepis等^[14]同样在光致变色材料上记录100层获得成功,并开始其商品化生产.

和平面二维存储相比,三维光学数据存储的实现可将存储密度提高几个数量级.目前使用的DVD的存储密度为 $2\text{Gbit}/\text{in}^2$.如果按Webb等人的存储方式,实现层内间距和层间间距分别达 $0.5\mu\text{m}$ 和 $3\mu\text{m}$,则在与现在的CD-ROM厚度(1.2mm)相同的介质中,可容易地记录400层,存储密度可高达 $1\text{Tbyte}/\text{in}^2$.这样,一张 3.5in 的光盘(记录区域为 $2-4\text{cm}$)的容量可达 5.8Tbyte ;一张 12cm 的光盘(记录区域为 $2.4-5.8\text{cm}$)可达 13.6Tbyte ; 1cm 大小的芯片可存储 155Gbyte 的数据;一张光盘可记录几十部电影!

影响双光子三维光学数据存储走向实用的关键因素之一是存储材料的研究.对材料的要求,主要在于:(1)对记录、读出光都应透明,无吸收.(2)记录时,产生的折射率差不能太小,也不能太大.太小,则读取时信号太弱;太大,则散射效应强.一般以 10^{-2} 左右为宜.目前在双光子三维存储中,广泛研究使用的材料主要有光折变聚合物、光折变晶体、光致变色材料以及其他相变材料等.因素之二则同样是对源器件的研究.如何解决透镜因空气与记录介质之间

巨大的折射率差导致的球差问题,以进一步缩小层间间距,提高存储密度;如何克服在存取介质深层信息时,由于反射、散射等原因导致的光能下降、信号强度减弱的毛病;以及高能激光器($1\text{kW}/\mu\text{m}^2$)或高灵敏度记录介质($1\text{W}/\mu\text{m}^2$)、灵巧三维存取系统等研制和开发等.所有这些因素,都是三维存储技术中必须解决的问题.

3.3 三维微细加工

用双光子吸收聚合的方法,在液态可聚合硬化的化合物中实现三维结构微细加工,可以克服单光子过程的空间选择性差的缺点,是一项很有应用前景的技术,尤其在光电子集成器件(如光子晶体、微型波导阵列等)的加工方面显示出巨大应用潜力.尽管和上述两方面的研究相比,双光子三维微细加工技术相对较晚一些^[15],但近几年来也取得了重要进展.1997年,Kawata等^[16]用双光子吸收技术首次在光致聚合物中制作出各种三维微观结构模型(见图3),其空间分辨尺度达到微米量级.他们所使用的装置原理图如图4所示.通过控制聚焦光束在液态聚合物中扫描,使液态聚合物固化形成所需要的三维结构.1999年,California理工学院的Cumpston等^[17],日本Tokushima大学的Sun等^[18]则通过此方式,制作了三维光子晶体、波导、悬臂阵列等器件

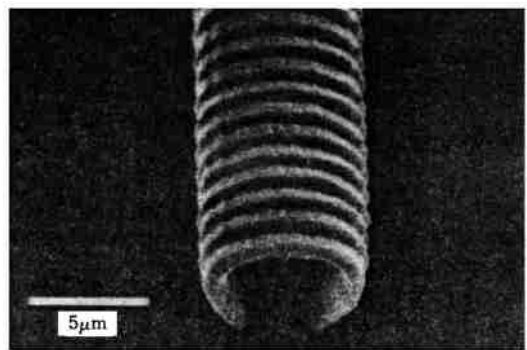


图3 双光子聚合形成的三维微结构的扫描电镜照片^[18]

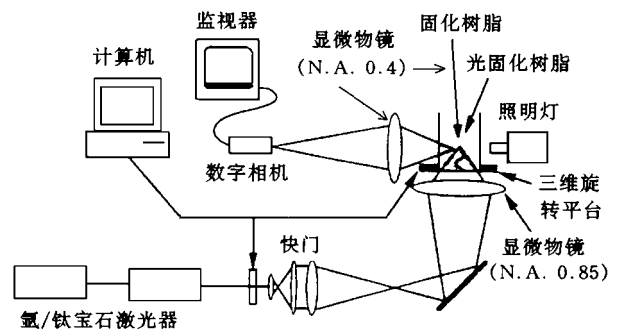


图4 双光子三维微细加工装置

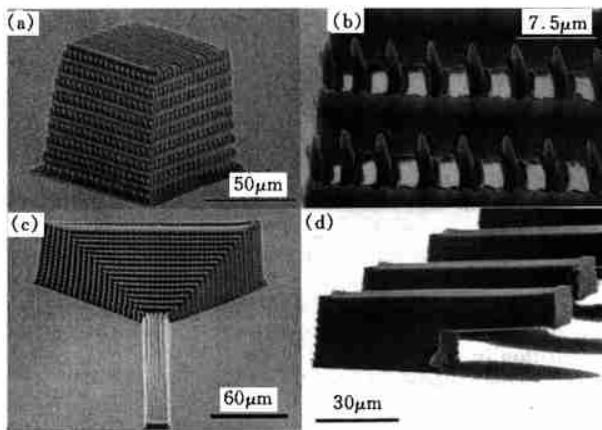


图5 双光子聚合制作的三维微结构
(a)光子带宽结构;(b)光子带宽结构的放大俯视;
(c)锥形波导结构;(d)悬臂列阵

(如图5所示)。

用双光子技术进行微细加工,尤其是加工三维光子晶体是当今最有科学意义的事件之一。但如何提高折射率反差以便获得具有较大的光子带宽的光子晶体,以及研制开发具有高灵敏度的双光子聚合引发剂等,则是该技术中正在竞相研究的课题。

4 结束语

鉴于双光子技术在未来光电子集成、生物分子探测、医学诊断等领域显示的巨大应用潜力和广阔应用前景,本文对双光子过程在三维荧光显微成像、三维数据存储以及三维微细加工等领域的应用研究进展进行了介绍。对双光子技术在上述领域的应用和发展产生重要影响的相关领域的研究动态也进行了简要讨论。必须指出,双光子技术在其他更广泛的领域,如局域催化反应等方面的研究都有非常重要

的应用价值。限于篇幅,不再详述。

致谢 感谢日本 Osaka 大学的 S. Kawata 教授、O. Nakamura 副教授,澳大利亚 Swinburn 工业大学的顾敏(Min Gu)教授给予的指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] Denk W, Strickler J, Webb W. *Science*, 1990, 248 :73
- [2] Gu M. *Principles of Three-dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. Singapore: World Scientific, 1996
- [3] Kano H, Van der Voort H T M, Schrader M *et al.* *Bioimaging* 1996, 4 :187—197
- [4] Hell S W, Schrader M, Van der Voort H T M. *J. Microsc.*, 1997, 187 :1
- [5] Bewersdorf J, Pick R, Hell S W. *Opt. Lett.*, 1998, 23 :655
- [6] Daria V, Blanca C M, Nakamura O *et al.* *Appl. Opt.*, 1998, 37 :7960
- [7] Kano H, Kawata S. *Opt. Lett.*, 1996, 21 :1848
- [8] Hell S W, Booth M, Wilms S. *Opt. Lett.*, 1998, 23 :1238
- [9] Betzig E, Trautman J K. *Science*, 1992, 257 :189
- [10] Sanchez E J, Novotny L, Xie X S. *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 82 :4014
- [11] Parthenopoulos D A, Rentzepis P M, *Science*, 1989, 245 :843
- [12] Strickler J H, Webb W W. *Opt. Lett.*, 1991, 16 :1780
- [13] Tanaka T, Kawata S. *CLEO/Pacific Rim'95*, 1995, 70
- [14] Wang M M, Esener S C, McCormick F B. *et al.* *Opt. Lett.*, 1997, 22 :558
- [15] Wu E S, Strickler J H, Harrell W R *et al.* *SPIE*, 1992, 1674 :776—782
- [16] Maruo S, Nakamura O, Kawata S. *Opt. Lett.*, 1997, 22 :132
- [17] Cumpston B H, Ananthal S P, Barlow S *et al.* *Nature*, 1999, 398 :51
- [18] Sun H B, Matsuo S, Misawa H. *Appl. Phys. Lett.*, 1999, 74 :786

(上接第 559 页)

- [9] Peng H B, Zhao B R, Xie Z *et al.* *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 82 :362
- [10] Peng H B, Zhao B R, Xie Z *et al.* *Appl. Phys. Lett.*, 1999, 74 :1606
- [11] 白春礼,林璋. *物理*, 1999, 28 :27 [BAI Chun-li, LIN Zhang. *Wuli (Physics)*, 1999, 28 :27 (in Chinese)]
- [12] Xie Z, Luo E Z, XU J B *et al.* *Rev. Sci. Instrum.*, 2000, 71 :2100
- [13] Soh Y A *et al.* *J. Appl. Phys.*, 1999, 85 :4607
- [14] Musevic I, Slak G, Blinc R. *Rev. Sci. Instrum.*, 1996, 67 :2554
- [15] Prilliman S G, Kavanagh A M, Scher E C *et al.* *Rev. Sci. Instrum.*, 1998, 69 :3245
- [16] Ealer R, Memmert U, Hartmann U. *Rev. Sci. Instrum.*, 1997, 68 :1776
- [17] Hug H S, Moser A, Jung Th *et al.* *Rev. Sci. Instrum.*, 1993, 64 :2920
- [18] Mou J, Yang J, Xhao Z. *Rev. Sci. Instrum.*, 1993, 64 :1483
- [19] Yuan C W, Batalla E, Zacher M *et al.* *Appl. Phys. Lett.*, 1994, 65 :1308
- [20] Baekmark T R, Bjrnhdn T, Moruitsen O G. *Rev. Sci. Instrum.*, 1997, 68 :140
- [21] Oulevey F, Gremaud G, Kulik A J *et al.* *Rev. Sci. Instrum.*, 1999, 70 :1889
- [22] Scott J F. *Ferroelectrics Review*, 1998, 1(1) :1