

探索更高光学显微分辨率的进程

(北京大学 朱星 摘译自 Anna Demming. *Physics World*, 2020, (10): 41)

几个世纪以来，衍射极限限制了光学显微镜的分辨率。然而，过去50年间，由于各种精密技术不断涌现，从光学镜头到探针、芯片和环形光场，使得光学显微镜的极限不断被突破。

1665年胡克(Robert Hooke)在物销书*Micrographia*中描述到：“这个怪物(跳蚤)披戴着光亮的黑色盔甲，像豪猪一样具有很多尖锐的刺”(图1)。书中包括许多动物、植物的精美图画。借助显微镜，人们首次看到了这些熟悉物体中平时观察不到的特征。

当时胡克使用的是组合式显微镜(用两枚凸透镜形成放大的图像)，自此之后，显微镜经历了漫长的发展。除了使用可见光的光学显微镜外，现在还有许多基于电子、X射线、原子力等其他成像技术。这些技术可以达到远远超过光学显微镜的分辨本领，为什么仍



图1 跳蚤的光学显微图像



图2 最早的光学显微镜。1673年列文虎克首次使用这个装置观察微生物

然需要光学成像方法?

光学显微镜依然能够持续应用的原因是光学成像方法具有独特的优势。当一个物体用脉冲光照射时，可以测量许多与能量相关的信息。这个物体可以散射、透过或者吸收光，使分子以不同的方式振动，将电子激发到不同的轨道，或者产生谐波共振。光在不同的波长产生的光谱能够给研究人员提供关于样品的化学和结构，以及所在环境的关键信息。

使用光学显微镜不需要冰冻样品，不需要将样品放置在真空中，不必用电子在强电场中轰击。因此，光学显微镜适用于观察活细胞，以及其他脆弱的样品。

然而，普通光学显微镜的作用仅仅到此为止。很长时间以来，观察任何小于几百纳米的样品要求超过了光学显微镜的能力，不能用光学显微镜对包裹神经元或者病毒的蛋白质分布进行成像。这是由于光学分辨本领受到基本物理原理——光学衍射极限的限制。

镜头与限制

列文虎克(Antonie van Leeuwenhoek)使用简单的单镜片仪器(图2)，结合敏锐的目光、很小心的照明，加上超凡耐心，在世界上第一次观察到了微生物的图像。1673

年，他在*Philosophical Transactions of the Royal Society*上写道，他所看到的是细菌和微生物，典型大小为0.5—5 μm。

当胡克证实这些观察结果时，他使用了更为精巧的组合式显微镜——即增加了一个目镜，将物镜已经放大的物体继续放大。

提高显微镜分辨率受到的障碍是衍射效应，就是当光绕过一个物体，或者通过一个光孔时，平面波的波前被改成曲面，它的传播方式好像投入池塘中的鹅卵石所形成的一系列圆环。当这些波重叠时，它们互相干涉，或者在波峰处倍增，或者在波谷处相消。存在一个能够分辨两个物体的最小距离，就是说，如果两个物体继续接近时，两个波峰互相叠加后而无法分辨。1873年阿贝(Ernst Abbe)定义了著名的衍射极限，即能够分辨两个物体的最小间距 d ， $d > \lambda/2n\sin\theta$ ， λ 是光波长， $n\sin\theta$ 是镜头的数值孔径。这个公式现在雕刻在德国耶拿的阿贝纪念碑上。

超越阿贝衍射极限

光是电磁波的一种，其以电磁场形式通过空间传播到我们的视网膜，这种光被称为远场。然而，每个散射或者发射远场光的物体同时具有附着于其表面的近场。近场光

是空间频率高、波长短的电磁波分量，它的强度在传播一个波长左右时就衰减了。

1928年，物理学家 E. H. Synge 建议，如果一个器件上有个微小的孔洞，放置在被照射物体表面一个波长以内，就可以用来探测近场光，从而形成超越衍射极限的影像。近场光的作用范围由光孔的位置决定，而光学分辨率仅取决于光孔的尺寸。44年以后，英国伦敦学院大学的 E. Ash 和 G. Nicholls 在微波成像中展示了突破衍射极限的分辨率。他们使用波长为 3 cm 的微波，得到的 1 cm 的分辨率仍然突破了衍射极限。

10年之后，Dieter Pohl 在 IBM 发明了扫描近场光学显微镜 (SNOM)，他们将金属镀在石英晶体表面，然后在玻璃表面敲打晶体的尖角，直到微弱的光透过，以此作为 Synge 提出的微小光孔。这样可以探测到近场区域的光信号。Pohl 等人在纳米尺度的标准样品上终于首次测量到了可见光波段的 SNOM 图像。分辨率达到 20 nm，已经远小于许多病毒。

从那以后，SNOM 走过了很长的道路。从薄片上的孔洞到金属镀膜的有孔探针(图3(a))。光从 SNOM 探针纳米尺度光孔中传出，以近场光形式照射样品，在样品上产生反射或者透射，散射光在远场被探测到。尽管这种从探针尖端散射的光仍然受到衍射极限的限制，但是也能够达到纳米分辨率。另外一种近场光学显微镜使用无孔探针(图3(b))。这种原子尺度金属针尖的探针(类似于原子力显微镜中的探针)被来自远场的入射光照亮，在样品表面进行纳米尺度扫描，产生的近场散射信号被远场探测。光引起电子

在探针表面的共振，由此在针尖附近高度局域化的区域内，产生表面等离子体，将局域电磁场信号聚集和放大。

SNOM 已经成为纳米尺度化学表征的重要工具之一，光学光谱确实比其他技术更具优势。SNOM 所产生的场增强在传感器、光刻和催化方面也起到很大作用。

更深入

SNOM 是一种表面测量技术，但是如何探测细胞组织内部的病毒呢？科学家发明了镜头与聚焦系统，使用更短的 X 射线去研究这类问题，但是，直到 1990 年代，深度成像仍然是一个难题。

1994 年，Hell 提出了一种突破衍射极限的方法，即基于荧光素进行深部成像。用特定波长的光激发出生物分子内的荧光，再用另外不同波长的光抑制激发。通过标准的圆形光激发分子，再用环形的光去淬灭它们，仅仅留下处于中心的分子未被淬灭。由于环形光强度向中心方向逐渐降低，因而中心位置的尺寸小于衍射极限。1999 年 Hell 展示了荧光激发与淬灭显微镜 (STED)，使一些分子保持不发荧光，或者使用不同波长的激光对荧光进行开关操作成为“纳米荧光显微镜”的核心技术。

由于 Hell, Betzig 和 Moerner 在发展超分辨荧光显微镜方面的杰出贡献，他们获得了 2014 年度的诺贝尔化学奖。然而，尽管理论上分辨率可达几纳米，但是实际操作中分辨率为几十纳米。Hell 意识到问题所在，改进之后使用 MINIFLUX 方

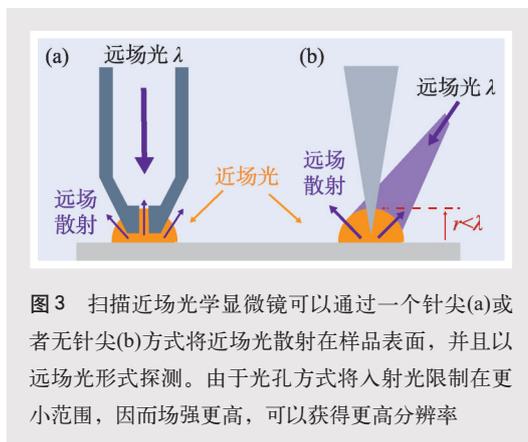


图3 扫描近场光学显微镜可以通过一个针尖(a)或者无针尖(b)方式将近场光散射在样品表面，并且以远场光形式探测。由于光孔方式将入射光限制在更小范围，因而场强更高，可以获得更高分辨率

法，用环形光束激发荧光素，而不是阻断荧光发射。这种技术通过测量偏离中心但是被激发分子的强度分布与预期强度分布进行校准。采用这种方法可以仅需少量光子就可达到 1—5 nm 的光学分辨率，采样时间仅为几十毫秒，并且，通过动态处理后，可以得到视频短片。Hell 说：“我认为这将为显微技术打开新领域。”

便携式近场光学显微镜

在实验室环境中，对像病毒这样的结构进行 20 nm 以下的成像，现在已经很常规了，但是光学显微镜仍然是笨重并且复杂的设备。2017 年 1 月，欧盟启动了 ChipScope 计划，用于设计较为便携的仪器。将扫描近场光学显微镜的优势与无镜头的显微镜相结合，使用数值分析的方法生成图像，可以在更广泛的领域中实现可视化的应用。未来整个显微镜的尺寸只有手机的一半大小。

自从列文虎克观察到细菌以来的 450 年间，出现了许多独创的光学技术发明，用于观察比病毒还小的形貌、样品内部甚至动态结构。可以想象，手机大小的全新显微镜或许最终能够替代今日热门的自拍相机。光学显微镜的魅力令人期待。