

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ
«Микроскопия высокого разрешения с использованием
диэлектрических микросфер»

Студента 2 курса магистратуры 2224 группы
направления 03.04.02 «Физика»
профиль «Биофотоника»
Соловьёва Т.Д.

Научный руководитель

доцент, к.ф.-м.н., доцент



И.В. Федосов

Зав. кафедрой

д.ф.-м.н., профессор



В.В. Тучин

Саратов 2021 г

1. Введение

Получение изображений изучаемых объектов очень важно для понимания процессов, протекающих в биологических объектах, оценке качества изготавливаемых электронных приборов, лекарств и продуктов, а также для проведения анализа биологических объектов. Для всех этих целей хорошо подходит современный оптический микроскоп. Он позволяет получать изображения с очень большой скоростью, без предварительной подготовки объекта исследования, в воздухе и без сложной последующей обработки результатов.

Но предельное разрешение оптического микроскопа ограничено дифракционным пределом Аббе и составляет $0,61$ длины волны света, освещающего объект [1,2].

В настоящее время созданы различные устройства, позволяющие получать изображения с разрешением большим, чем у оптического микроскопа: сканирующий электронный микроскоп, просвечивающий электронный микроскоп, флуоресцентный микроскоп, атомно-силовой микроскоп, ближнепольный оптический микроскоп [3-10,16]. Однако эти методы имеют ограничения из-за низкой скорости получения изображений, сложной подготовки объектов исследования и малого количества образцов, доступных для изучения. От этих недостатков свободны диэлектрические микросферы. Они позволят получать изображения любых объектов почти без предварительной подготовки и с разрешением, превышающим дифракционный предел. Микросферы так же можно комбинировать с другими методами микроскопии: флуоресцентным, конфокальным и атомно-силовыми микроскопами [49-52]. Это позволяет объединить преимущества каждого метода.

2. Литературный обзор

2.2 Микроскопия с использованием диэлектрических сфер

Первая статья, описывающая применение диэлектрических микросфер для получения изображений со сверхразрешением вышла в 2011 году [11]. В этой работе было получено разрешение 50 нм при наблюдении через объектив $\times 80$ ($NA=0.9$, Olympus MDPlan) при освещении объектов белым светом. Микросферы (SiO_2 , $d = 4,74$ мкм, $n = 1,46$) расположили на поверхности образцов путём самосборки.

В режиме пропускания получены изображения решёток с толщиной линий 360 нм и расстоянием между линиями 130 нм (решётка изготовлена из хромовой плёнки толщиной 30 нм, нанесённой на подложку из кварца) и пор из анодного оксида алюминия (ААО), покрытых золотом, диаметром 50 нм с расстоянием между порами 50 нм. В режиме отражения получены изображения канавок Blu-ray DVD диска (линии шириной 200 нм, отстоящие на 100 нм друг от друга).

Авторы объясняют полученное сверхразрешение способностью микросфер генерировать, при определённых условиях, фотонные струи. Расчёты показали, что для сфер с $n = 1,46$ окно сверхразрешения, в котором генерируются фотонные струи, существует для микросфер с $2 \text{ мкм} < d < 9 \text{ мкм}$. Расчёт был подтверждён экспериментально.

Получение изображений со сверхвысоким разрешением и большим полем зрения при полном погружении микросфер представлено в работе [16]. С помощью микросфер из титаната бария (BTG), полностью погруженных в изопропиловый спирт, демонстрируют сверхразрешение на золотых цилиндрах, отстоящих друг от друга на расстоянии 320 нм и 800 нм и DVD Blu-ray диске (BD). Микросферы с высоким показателем преломления позволяют производить наблюдение за биологическими объектами, погружёнными в

жидкость и получать большое поле обзора.

Метод позиционирования и контролируемого перемещения микросфер для получения изображений с высоким разрешением представлен в 2013 году [19]. Микросферы приклеиваются к стеклянной пипетке из бромосиликатного стекла УФ-отверждаемым клеем или удерживаются на ней за счёт отсоса воздуха. Пипетка закреплена на трёхосевой трансляционной платформе. Показана возможность получать изображения с движущейся микросферы. Чёткие изображения удалось получить на скорости 1,5 мкм / сек (для полимерной решётки) и 650 нм / сек (для квадратов из золота) при 15 кадрах в секунду.

Наблюдение аденовирусов с помощью микросфер и описание механизма сверхразрешения при помощи наноструй и представлено в работе [20]. Исследователи продемонстрировали оптическую визуализацию вирусов в белом свете, с использованием погруженных микросфер из BaTiO_3 . Объектом наблюдения были выбраны аденовирусы 5 типа с диаметром 75 нм.

В оптической системе микросферного микроскопа микросфера выполняет две функции: создание фотонной наноструи и пробразование затухающих волн, несущих информацию о наносразмерных деталях образца, в распространяющиеся волны.

Исследование свойств сверхразрешения микросфер находящихся не в контакте с поверхностью объекта провели авторы статьи [21]. На Blu-ray диск с помощью центрифуги нанесли фоторезист SU-8 ($n = 1,6$). Изменение скорости центрифугирования позволило нанести на поверхность диска слои толщиной от 0,39 до 14 мкм. После полимеризации фоторезиста на него помещали SiO_2 микросферы диаметром 4,87 мкм. Наилучший контраст получали при полупогруженных в этанол микросферах. Авторы показали что расстояние между диском и микросферами (d) не является препятствием для получения изображений со сверхвысоким разрешением.

Строгий теоретический расчёт сверхразрешения микросфер с

применением классической теории рассеяния Ми осуществлён в работе [22].

Критерием разрешения двух светящихся точек взята полная ширина на уровне половинной амплитуды (FWHM). Для моделирования освещения белым светом было выбрано 110 длин волн в спектре 400 нм ~ 700 нм. При таком освещении белым светом микросфера ($d = 4,74$ мкм, $n = 1,46$) может разрешать два диполя, разнесённых на 150 нм, но не разрешает разнесённые на 100 нм.

Исследователи изучили свойства диэлектрических микросферы из разных материалов [15,16,39]. Так же были разработаны системы сканирования, повышающие эффективность визуализации микросферных микроскопов [19, 26, 27]. Непрекращающийся интерес к микросферам демонстрирует, что эта тема актуальна и перспективна.

2.3 Оптические методы скомбинированные с микросферами

Результаты применения техники, объединяющей микросферы со сканирующим лазерным конфокальным микроскопом для получения изображений сверхвысокого разрешения представлены в работе [49].

Конфокальная микроскопия с использованием микросфер позволяет получать изображения с более высоким разрешением, чем конфокальный микроскоп сам по себе.

Объединение микросферы и атомного силового микроскопа (scanning superlens microscopy (SSUM)) позволяет осуществлять сканирование в двух режимах: в контактном режиме для твёрдых объектов и в режиме постоянной высоты для биологических объектов [51]. Микросфера закрепляется на сканирующей зонде (УФ-отверждаемым клеем). Расстояние и силы взаимодействия между микросферами и образцами регулируются с использованием принципов АСМ. В контактном режиме микросфера контактирует с образцом во время сканирования. В этом режиме было получено изображение BD-диска в воде при помощи микросферы из титаната бария ($d=59$ мкм). Сканирование площади 96×96 мкм² осуществили за три минуты со

скоростью сканирования 0,2 Гц (через объектив 50x, NA=0,6). В режиме скаирования с постоянной высотой был исследован центральный процессор и различили случайно распределенные серебряные нанопроволоки (AgNW), покрытые оптически прозрачной полистирольной пленкой толщиной ~ 11 нм их визуализировали микросферой BaTiO₃ диаметром 57 мкм в воде. Так же в этом режиме были получены оптические и флуоресцентные изображения клеток миобластов мыши (C2C12) и клеток рака груди человека (MCF-7) с использованием микросфер BaTiO₃ диаметром 59 или 63 мкм в воде.

Комбинация микросфер и конфокального, флуоресцентного или атомно-силового микроскопа позволяет расширить область применения этих методов.

3. Экспериментальная часть

3.1 Материалы и методы

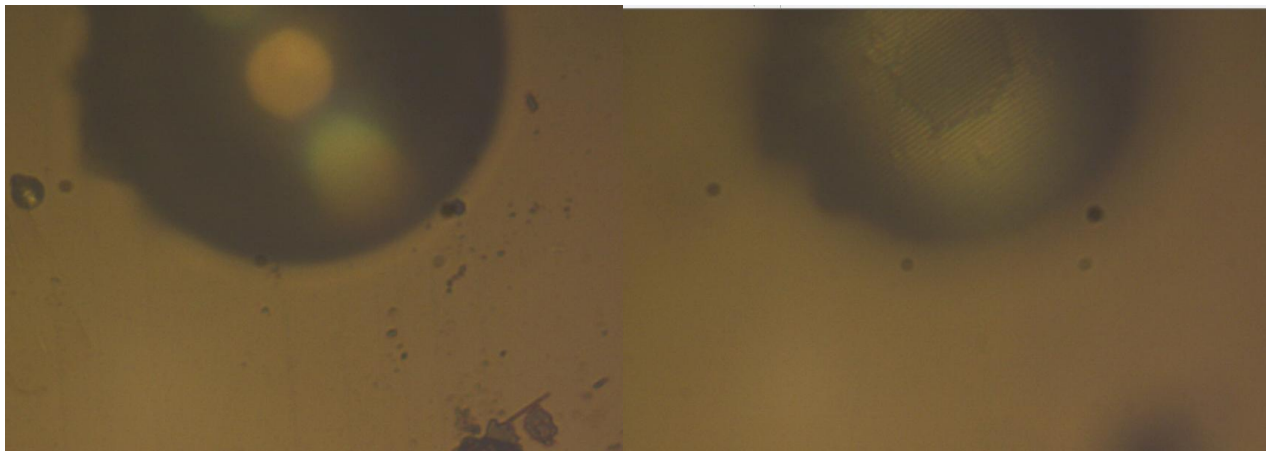
Экспериментальное исследование разрешения и увеличения микросфер проводилось с остеклянными микросферами диаметром 200-500 мкм. Изображения получены на микроскопе МБИ-15 с объективами 8x (NA = 0,2) и 20x (NA = 0,4). Для освещения объектов использовалась галогенная лампа. Так же использовался микроскоп МЛ-2Б с объективами ПЛАН 9x (NA = 0,2), ПЛАН 25x (NA = 0,5) и объектив на тубус бесконечности АПО F-4,3 с NA=0,95 (при использовании тубусной линзы на 160 мм увеличение объектива равно 40x). Объекты освещались светодиодом (10 Вт, 4000 К). Все объективы изготовлены на Ленинградском оптико-механическом объединении (ЛОМО).

В качестве объектов для исследования были использованы: микросхема, кожица лука, DVD-диск(на 4,7 Гб). Микросферы помещали на поверхность объектов.

3.2 Результаты экспериментов

Для исследования дорожек DVD-диска с него был удалён защитный слой и на поверхности диска были расположены микросферы. Фокусируясь на поверхности дорожек фиксировалось направление дорожек и расстояние между

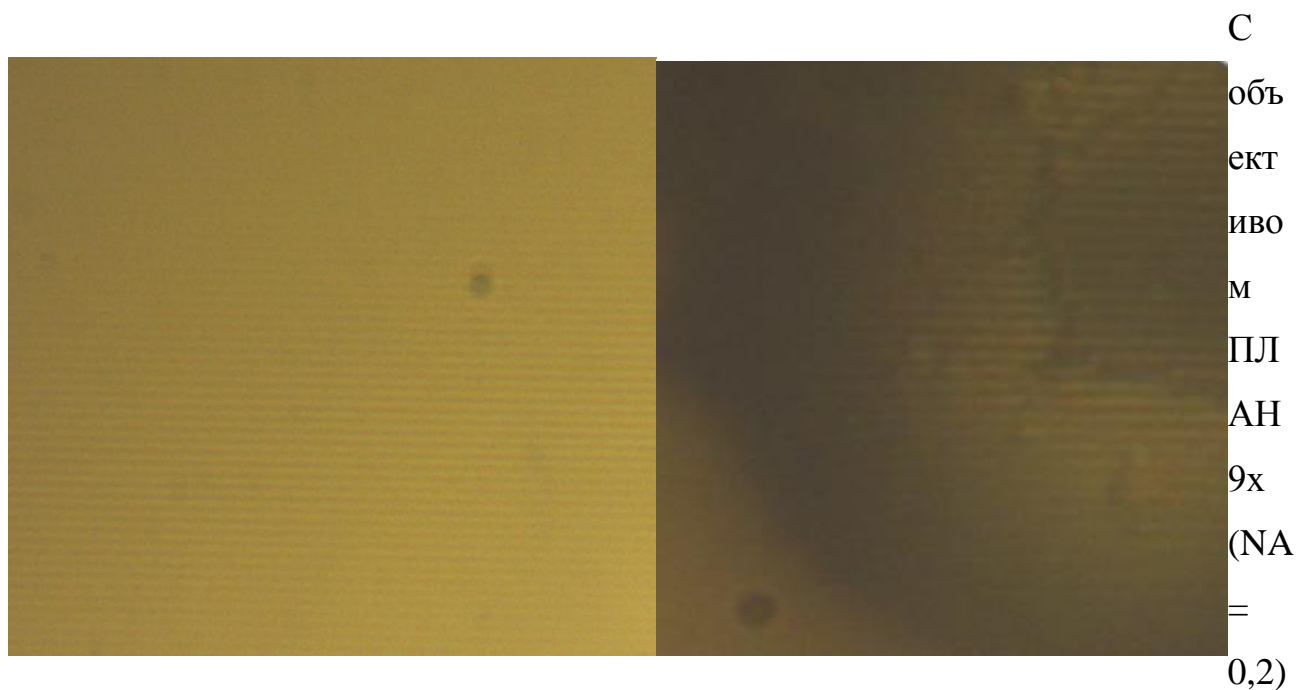
ними в пикселях, если это позволял объектив. Затем объектив фокусировали на мнимом изображении дорожек и фиксировали изображение. Простое и



увеличенное изображение сравнивалось для расчёта увеличения сферы.

Рис. 1 Изображение дорожек DVD-диска через объектив 9x (слева) и микросферу(справа)

Рис. 1 Изображение дорожек DVD-диска через объектив 9x (слева) и микросферу(справа)



увеличение микросферы составляет 3,55 раз.

Рис. 3. Изображение дорожек DVD-диска через объектив АПО F-4,3 с $NA=0,95$ (слева) и через объектив ПЛАН 9х ($NA = 0,2$) с микросферой (справа).

Изображения получаемые с помощью объектива 9х с применением микросфер и объектива 40х и близки по качеству и детализации.

В качестве объекта со сложной структурой и большим количеством деталей была взята микросхема. Наблюдение проводилось с объективами 8х и 20х в отражённом свете. В качестве биологического объекта использовали клетки репчатого лука. С поверхности лука сняли кожицу. Затем расположили диэлектрические сферы на поверхности клеток лука и получили их увеличенные изображения.

Заключение

Были исследованы увеличивающие свойства диэлектрических микросфер диаметром 200-500 мкм с помощью построенной экспериментальной установки. В результате исследования была получена возможность использовать объективы с небольшим увеличением и большим фокусным расстоянием для получения высококачественных изображений с большим увеличением.

Было рассчитано увеличение микросфер с помощью полученных изображений. Коэффициент увеличения используемых микросфер составляет 3,39 -3,55.

Использование микросфер позволяет получать более качественные изображения объектов с объективами, имеющими небольшое увеличение. В качестве исследуемых объектов выступали периодические структуры дорожек DVD-диска, полупроводниковый чип и клетки репчатого лука.

С помощью микросферы диаметром 200 мкм и объектива ПЛАН 9х (NA = 0,2) было получено изображение по увеличению и качеству не уступающее изображению полученному с более мощным объективом АПО F-4,3 с NA=0,95 с увеличением 40х.

Список литературы

1. Abbe E. VII.—On the Estimation of Aperture in the Microscope. *J R Microsc Soc.* 1881;1: 388–423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1881.tb05909.x>
2. Миланич А.И., Баранов А.А. «Труды МФТИ» том 4, № 2 (14) (2012) (дата обращения 17.07.20) URL: https://mipt.ru/upload/f86/f_g7cr-arphcx11tgs.pdf
3. Ultra-high Resolution Scanning Electron Microscope SU9000 (дата обращения 15.07.20) URL: <https://www.hitachi-hightech.com/global/science/products/microscopes/electron-microscope/fe-sem/su9000.html>
4. Jiang, Y., Chen, Z., Han, Y. *et al.* Electron ptychography of 2D materials to deep sub-ångström resolution. *Nature* 559, 343–349 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0298-5>
5. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) Imaging (дата обращения 17.07.20) URL: <https://www.microscopyu.com/tutorials/stochastic-optical-reconstruction-microscopy-storm-imaging>
6. Микроскоп сверхвысокого разрешения Nikon N-Storm (дата обращения 1.08.20) URL: <https://microscope.ru/mediko-biologicheskie-mikroskopyi/super-resolution/nikon-n-storm>
7. Атомно-силовая микроскопия (Дата обращения 1.08.20) URL: http://www.ckpgene.ru/left/atomno-silovaya_mikroskopiya/
8. Сканирующий атомно-силовой микроскоп Park NX10 (Дата обращения 1.08.20) URL: <https://www.czl.ru/catalog/microscope/atomic-force-microscopes/park-nx10.html>
9. Сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия с использованием зондов кантеливерного типа. На правах рукописи(Дата обращения

- 2.08.20) URL: <http://www.nrcki.ru/files/pdf/1503411552.pdf>
10. Dürig U, Pohl DW, Rohner F . Near-field optical-scanning microscopy. *J Appl Phys* 1986; 59: 3318–3327. <https://doi.org/10.1063/1.336848>
 11. Wang, Z., Guo, W., Li, L. *et al.* Optical virtual imaging at 50 nm lateral resolution with a white-light nanoscope. *Nat Commun* 2, 218 (2011). <https://doi.org/10.1038/ncomms1211>
 12. Daniel S. Benincasa, Peter W. Barber, Jian-Zhi Zhang, Wen-Feng Hsieh, and Richard K. Chang, "Spatial distribution of the internal and near-field intensities of large cylindrical and spherical scatterers," *Appl. Opt.* 26, 1348-1356 (1987) <https://doi.org/10.1364/AO.26.001348>
 13. Zhigang Chen, Allen Taflove, and Vadim Backman, "Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles: a potential novel visible-light ultramicroscopy technique," *Opt. Express* 12, 1214-1220 (2004) <https://doi.org/10.1364/OPEX.12.001214>
 14. Hao, X.; Kuang, C.; Liu, X.; Zhang, H.; Li, Y. Microsphere Based Microscope with Optical Super-Resolution Capability. *Appl. Phys. Lett.* 2011, 99, 203102. <https://doi.org/10.1063/1.3662010>
 15. Hao, X., Kuang, C., Li, Y., Liu, X., Ku, Y., & Jiang, Y. (2012). *Hydrophilic microsphere based mesoscopic-lens microscope (MMM)*. *Optics Communications*, 285(20), 4130–4133. doi:10.1016/j.optcom.2012.06.013
 16. Darafsheh, A., Walsh, G. F., Dal Negro, L., & Astratov, V. N. (2012). *Optical super-resolution by high-index liquid-immersed microspheres*. *Applied Physics Letters*, 101(14), 141128. doi:10.1063/1.4757600
 17. Lee, S., Li, L., Wang, Z., Guo, W., Yan, Y., & Wang, T. (2013). *Immersed transparent microsphere magnifying sub-diffraction-limited objects*. *Applied Optics*, 52(30), 7265. doi:10.1364/ao.52.007265
 18. Lee, S., Li, L., Ben-Aryeh, Y., Wang, Z., & Guo, W. (2013). *Overcoming the diffraction limit induced by microsphere optical nanoscopy*. *Journal of Optics*, 15(12), 125710. doi:10.1088/2040-8978/15/12/125710
 19. Krivitsky LA, Wang JJ, Wang Z, Luk'yanchuk B. Locomotion of microspheres for super-resolution imaging. *Sci Rep.* 2013 Dec 16;3:3501. doi: 10.1038/srep03501. PMID: 24336231; PMCID: PMC3863983.
 20. Li, L., Guo, W., Yan, Y. *et al.* Label-free super-resolution imaging of adenoviruses by submerged microsphere optical nanoscopy. *Light Sci Appl* 2, e104 (2013). <https://doi.org/10.1038/lsa.2013.60>
 21. Ye, R., Ye, Y.-H., Ma, H. F., Ma, J., Wang, B., Yao, J., Zhang, J.-Y. (2013). *Experimental far-field imaging properties of a ~5- μ m diameter spherical lens*.

- Optics Letters*, 38(11), 1829. doi:10.1364/ol.38.001829
22. Duan, Y., Barbastathis, G., & Zhang, B. (2013). *Classical imaging theory of a microlens with super-resolution*. *Optics Letters*, 38(16), 2988. doi:10.1364/ol.38.002988
 23. C. Sheppard, *Optik* 48, 329 (1977)
 24. Li, P.-Y., Tsao, Y., Liu, Y.-J., Lou, Z.-X., Lee, W.-L., Chu, S.-W., & Chang, C.-W. (2016). *Unusual imaging properties of superresolution microspheres*. *Optics Express*, 24(15), 16479. doi:10.1364/oe.24.016479
 25. H. Yang, N. Moullan, J. Auwerx, and M. A. M. Gijs, “Super-Resolution Biological Microscopy Using Virtual Imaging by a Microsphere Nanoscope,” *Small* 10(9), 1712–1718 (2014).
 26. Yan, B., Wang, Z., Parker, A. L., Lai, Y., John Thomas, P., Yue, L., & Monks, J. N. (2017). *Superlensing microscope objective lens*. *Applied Optics*, 56(11), 3142. doi:10.1364/ao.56.003142
 27. Huszka G, Gijs MAM. Turning a normal microscope into a super-resolution instrument using a scanning microlens array. *Sci Rep*. 2018 Jan 12;8(1):601. doi: 10.1038/s41598-017-19039-6. PMID: 29330492; PMCID: PMC5766610.
 28. Ye, R., Ye, YH., Ma, H. *et al.* Experimental imaging properties of immersion microscale spherical lenses. *Sci Rep* 4, 3769 (2014). <https://doi.org/10.1038/srep03769>
 29. Lai HS, Wang F, Li Y, Jia B, Liu L, Li WJ. Super-Resolution Real Imaging in Microsphere-Assisted Microscopy. *PLoS One*. 2016 Oct 21;11(10):e0165194. doi: 10.1371/journal.pone.0165194. PMID: 27768774; PMCID: PMC5074592.
 30. L. Yao, Y. H. Ye, H. F. Ma, L. L. Cao, and J. L. Hou, “Role of the immersion medium in the microscale spherical lens imaging,” *Opt. Commun.* **335**, 23–27 (2015)
 31. Migliozi D, Gijs MAM, Huszka G. Microsphere-mediated optical contrast tuning for designing imaging systems with adjustable resolution gain. *Sci Rep*. 2018 Oct 12;8(1):15211. doi: 10.1038/s41598-018-33604-7. PMID: 30315280; PMCID: PMC6185990.
 32. Yang S, Wang X, Wang J, Cao Y, Wang F, Chen T, Ye YH. Reduced distortion in high-index microsphere imaging by partial immersion. *Appl Opt*. 2018 Sep 20;57(27):7818-7822. doi: 10.1364/AO.57.007818. PMID: 30462047.
 33. Chen, L., Zhou, Y., Li, Y., & Hong, M. (2019). *Microsphere enhanced optical imaging and patterning: From physics to applications*. *Applied Physics Reviews*, 6(2), 021304. doi:10.1063/1.5082215
 34. Ben-Aryeh, Y. (2012). *Superresolution observed from evanescent waves*

- transmitted through nano-corrugated metallic films. Applied Physics B, 109(1), 165–170. doi:10.1007/s00340-012-5193-4*
35. Guo, H., Han, Y., Weng, X., Zhao, Y., Sui, G., Wang, Y., & Zhuang, S. (2013). *Near-field focusing of the dielectric microsphere with wavelength scale radius. Optics Express, 21(2), 2434. doi:10.1364/oe.21.002434*
36. Duocastella M, Tantussi F, Haddadpour A, Zaccaria RP, Jacassi A, Veronis G, Diaspro A, Angelis F. Combination of scanning probe technology with photonic nanojets. *Sci Rep.* 2017 Jun 14;7(1):3474. doi: 10.1038/s41598-017-03726-5. PMID: 28615621; PMCID: PMC5471276.
37. Yang S, Wang F, Ye YH, Xia Y, Deng Y, Wang J, Cao Y. Influence of the photonic nanojet of microspheres on microsphere imaging. *Opt Express.* 2017 Oct 30;25(22):27551-27558. doi: 10.1364/OE.25.027551. PMID: 29092226.
38. Arash Darafsheh 2021 *J. Phys. Photonics* **3** 022001
<https://doi.org/10.1088/2515-7647/abdb05>
39. Jia B, Wang F, Chan H, Zhang G, Li WJ. In situ printing of liquid superlenses for subdiffraction-limited color imaging of nanobiostructures in nature. *Microsyst Nanoeng.* 2019 Jan 14;5:1. doi: 10.1038/s41378-018-0040-3. PMID: 31057928; PMCID: PMC6330505.
40. Darafsheh, A., Limberopoulos, N. I., Derov, J. S., Walker, D. E., & Astratov, V. N. (2014). *Advantages of microsphere-assisted super-resolution imaging technique over solid immersion lens and confocal microscopies. Applied Physics Letters, 104(6), 061117. doi:10.1063/1.4864760*
41. Yan, Y., Li, L., Feng, C., Guo, W., Lee, S., & Hong, M. (2014). *Microsphere-Coupled Scanning Laser Confocal Nanoscope for Sub-Diffraction-Limited Imaging at 25 nm Lateral Resolution in the Visible Spectrum. ACS Nano, 8(2), 1809–1816. doi:10.1021/nn406201q*