

# 近场光学及其应用

王柯敏

谭蔚泓

白春礼

(湖南大学化学化工系, 长沙 410082)

(中国科学院化学研究所, 北京 100080)

**[摘要]** 介绍近场扫描光学显微镜、分子激子显微镜和亚微米光纤化学传感器及其应用, 展望近场光学技术的发展方向。

**[关键词]** 近场光学, 近场扫描光学显微镜, 分子激子显微镜, 亚微米光纤化学传感器

长期以来光学显微技术一直是医学、生物、化学和材料科学研究中应用最普遍的关键技术。与其它显微成像技术比较, 光学显微技术表现出如下独特的优点: (1) 通用性。由于许多材料与样品都能与光作用并表现出不同的光谱状态, 从而能用光学显微镜观察; (2) 无损性。只要物镜和样品之间的介质能透光, 就可不改变被测体系的本来环境进行观察; (3) 简便性。除偶尔要对样品进行标记、染色和切片外, 大多数情况下用光学显微镜观察样本并不需要样品制备过程; (4) 实时观察。生物现象、化学反应等在进行过程中可通过光学显微镜现场观察, 许多工业过程的光谱测量也能在线完成; (5) 基于吸收、散射、折射、反射和发光等光学性质构成了光学显微成像技术丰富的反差机理。但是在传统的光学显微镜中, 光源与样品之间的距离大于照明光波长。由于光波的衍射作用, 这类显微镜的空间分辨能力存在一众人所周知的衍射极限, 这一理论极限约为光源光波长的一半。电子显微镜和 X-射线显微镜并未突破传统光学显微镜的衍射理论极限, 而是通过显著减少照明光波长来提高对样品的绝对分辨能力。

80年代初以来, 以扫描隧道显微镜 (Scanning Tunneling Microscopy, STM)<sup>[1]</sup> 为代表的新一代扫描探针显微镜 (Scanning Probe Microscopy, SPM) 的发展, 使人类在观察微观世界的进程上经历了革命性的变化。这类显微镜由于其探针与样品表面极其邻近, 因此, 其分辨能力主要取决于探针的几何尺寸。目前这类显微技术多能获得具有原子分辨率的图象<sup>[2]</sup>。

最近几年, 在吸收了其它扫描探针显微技术的许多成熟技术后, 一种建立在近场光学基础上的新型光学显微镜——近场扫描光学显微镜 (Near-field Scanning Optic Microscopy, NSOM) 得以迅速发展。NSOM 的发展反过来又促进了近场光学技术的发展, 由之派生出分子激子显微镜 (Molecular Exciton Microscopy, MEM)、亚微米光纤化学与生物传感器 (Submicrometer Fiber Optic Chemical and Biological Sensors, SFOCBS) 等新技术, 并已经表现出了诱人的应用前景。

## 1 近场扫描光学显微镜

设想在一遮光薄板材料上打一个亚波长尺寸的小孔, 让照明光透过小孔照到样品上, 如

本文于 1994 年 11 月 28 日收到。

果样品离这一小孔光源的距离远小于照明光波长(即将样品置于光源的近场区)时,则样品上被照到的光斑尺寸大小将与小孔光源尺寸的大小相当,而与照明光的波长无关。上述概念早在1928年由Synge<sup>[3]</sup>提出,但是直到80年代才真正从近场光学实验上实现这一原理<sup>[4]</sup>。图1所示为近场光学显微镜的检测原理。从技术上实现NSOM主要存在下述困难:(1)需要有足够辐射强度而尺寸又尽可能小的亚波长探针型光源;(2)需要让探针在尽可能靠近样品的情况下对其进行快速扫描;(3)需要有效的反馈机制来控制探针与样品表面的距离以避免二者的物理接触。通过结合STM或扫描力显微镜(Scanning Force Microscopy, SFM)较为成熟的空间控制技术,后面两个问题已经得到较好的解决<sup>[5,6]</sup>,而制备具有足够辐射强度的亚波长光源则仍是该项技术进步的关键因素。

曾用于细胞内电测量的玻璃微吸管最先被用于制备亚波长空心探针光源<sup>[7]</sup>。微吸管的外壳通过溅射的方法涂覆有一层能阻挡光线的金属薄层。现在用商品微吸管控制机可方便地拉制出不同大小的微吸管。以微吸管为探针的光学显微镜目前达到的最佳分辨率约为500 Å。但是,并不能通过拉制更微小微吸管来获得更高的分辨力,因为当光线波长远大于小孔孔径时,小孔孔径每减小一个数量级,小孔光源的辐射强度将减小约20个数量级<sup>[8]</sup>!为了获得有足够反差的图象,空心探针的孔径不能过小。这种空心光源通常称为被动光源。为了获得更高的分辨能力,发展了一种半主动光源,即纳米光导纤维探针<sup>[9]</sup>。这种实心的光纤在光的传导方面较空心的玻璃微吸管更为有效,由于同轴波导的原因,光导纤维光源的辐射强度较相同尺寸的空心微吸管光源有明显加强。目前已研制成功分辨能力达到12 nm的光纤探针。但是最细的商品单模光导纤维的芯径一般也有几个微米,在其成为探针之前要进行专门的拉制,以获得亚微米大小的光纤针尖。除了前述微吸管控制机外,还需要一专门的二氧化碳红外激光器对拉制部位进行加热<sup>[9]</sup>。

各种各样的成像机理,如吸收、折射率、反射和荧光(或发光)等已用于NSOM。NSOM也使用不同类型的扫描探针。图2是以透射方式成像的NSOM的基本结构。另一种SNOM的光学探针并不作为光源,而是起光子收集作用,这就是所谓的光子扫描隧道显微镜(Photon Scanning Tunneling Microscopy, PSTM)<sup>[10]</sup>。如图3所示,当一束入射光在棱镜工作面发生全内反射时,即可在该反射面的外侧产生一个消失场。该消失场沿反射面上的样品边界传播,其振幅、场强随离界面的距离的增大呈指数衰减,显然消失场的场分布状态包含有样品的表面特征信息。让一个非常细小的光学探针(通常是化学蚀刻的光纤)靠近置于棱镜工作台面上的样品表面对其进行扫描,当探针处在棱镜光波的消失场范围内时,消失场的光子能“隧穿”到达探针对探针所检测,如果通过改变探针与样品表面的距离维持光子数量恒定,就可获得样品表面的结构信息。最近,中科院北京电子显微镜开放实验室与大连理工大学合作研制成功的PSTM,其横向分辨率优于10 nm,纵向分辨率优于1 nm<sup>[11]</sup>。

NSOM较其他显微镜更能发挥用武之处是在化学、生物、环境和医学等领域中样品的纳米分析。采用NSOM已经获得如细胞骨架肌动蛋白、创伤愈合过程中形成的细胞鼓突、血细胞和DNA等重要样品的显微图像,其分辨力在50 nm左右<sup>[12]</sup>。这些信息对于生理与医学研究无疑是非常重要的。最近由NSOM对荧光标记DNA分子迁移动力学研究也取得重要进展<sup>[13,14]</sup>。NSOM还能获取有关L-B膜和聚合物膜等有机物表面的清晰图像<sup>[12]</sup>,这对于化学和材料科学也是非常有意义的。

## 2 分子激子显微镜

探针光源的小型化与辐射强度之间的矛盾阻碍了 NSOM 的发展,为了解决这一问题,Kopelman 等人首次用分子激子作为主动光源替代被动小孔光源获得成功。他们将能发光的分子晶体如蒽、芘、并四苯等沉积在微吸管针尖内,构成了具有纳米尺寸的发光主动光源<sup>[16]</sup>,并用类似于绿色植物光合成系统的近场光聚合方法,可在纳米光纤探针上化学接枝有荧光活性基团的染料<sup>[16]</sup>,通过控制光纤针尖在单体溶液中的深度、近场光照强度以及单体溶液的组成,在光纤针尖上形成一个由发光材料构成的超针尖。这种主动光源的尺寸可小至一个分子大小。图 4 表示了一个用微吸管制备的主动光源,其主要原理就是将光子转变成物理意义上更小的能量载体激子<sup>[17]</sup>,随后又将这一能量子转变为光子,光能通过这样的转变可有效地传递到探针的顶部。当探针孔径大小相同时,主动光源要比被动光源发出的光强得多。

如果激子的这种传递仅发生在光源内部,则可在 NSOM 中构造既有足够辐射强度而又比以往的被动光源尺寸小得多的探针,用来提高分辨能力。而当激子的这种能量传递发生在探针与样品之间时,则导致了一种全新的光学显微技术——分子激子显微镜(MEM)问世。图 5 是 MEM 中探针与样品之间相互作用的示意图。超针尖的某个激子作为活性中心起到了能量给体的作用,样品中的某些生色体或重原子作为受体可通过能量转移或自旋耦合效应使给体发生荧光能量转移或熄灭。当超针尖与样品的距离足够近时,样品的这种非辐射直接荧光激发要比通常的光辐射激发有效得多。以罗丹明染料分子为例,根据其吸收截面积,这样一个简单分子吸收一个光子需要  $10^9$  个光子的作用,但是产生同样的效果只需要一个合适的激子<sup>[18]</sup>。这也形象地理解成激子可以从 MEM 的超针尖隧穿到达样品表面。将激子探针对样品表面扫描,检测受体的发射出现或者给体发射强度的减少就可以获得具有分子分辨能力的 MEM 图象。MEM 似乎是一种既有类似 STM 的分辨能力又保持光学显微镜优点的新型显微技术。它的第一个应用将会是遗传基因的排序分析<sup>[19]</sup>。

## 3 亚微米光纤化学与生物传感器

在各种类型的化学传感器中,应用最普遍最令人感兴趣的是光化学传感器与电化学传感器<sup>[20]</sup>。光化学传感器比电化学传感器年轻 20 多年,具有极大的潜力与许多优越性<sup>[21]</sup>,但在探头的小型化与响应时间方面较电化学传感器有较大的差距。目前报道的最小的光纤传感器探头大小约为  $100\ \mu\text{m}$ <sup>[22]</sup>,响应时间一般为数秒或数分钟。要使目前的光纤探头做得更小存在两个主要的困难:一是如何由商品光纤拉制更小的针尖或探头;二是如何在针尖或探头上固定敏感试剂。通过成膜或其他机械方法固定试剂不适于在这样微小的探头上采用,NSOM 和 MEM 技术的发展可使这两个问题迎刃而解。前述拉制光纤探针制备纳米光源的方法同样适于制备亚微米光纤传感器探针,而新发展的近场光聚合方法可以共价键的方式直接将敏感成分连接在极小的探针表面<sup>[23]</sup>。第一支亚微米光纤传感器已经问世<sup>[24]</sup>,该探针的表面通过光聚合连接了对 pH 敏感的荧光染料,可用于微区 pH 值测量。其探头大小仅  $0.1\ \mu\text{m}$ ,由于较以往的光纤传感器小了一千倍,所需样品体积可减少到  $10^{-15}$  升 (fL),检测下限可达 3000 个氢离子,响应时间也缩短到毫秒数量级。这一目前世界上最小的光纤 pH 传感器已用于兔胚胎的 pH 测量<sup>[25]</sup>,这是第一例在单个活着的兔胚胎中进行的实验。在 pH 监控状态下,该兔胚胎能

正常的成长,仪器可给出其成长期不同天数的 pH 值,而以前获取这样的数据需要将 1000 个以上的胚胎捣碎后测其平均 pH 值。这样的传感器已进一步用于检测单细胞或多细胞组织的 pH 值因环境条件变化或受化学药品刺激后的动态变化。这些结果在生理与医学上具有极其重要的意义。

#### 4 展望

NSOM, MEM 和 SFOCBS 只是近年蓬勃兴起的高新技术,尚处在成长阶段。但它初一问世就引起了发达国家的重视与关注,预计不久的将来会在以下几个方面实现新的突破:

(1) 目前大多数扫描探针显微镜仅能研究样品的外形结构,而难于获得样品的化学与生物信息。将 NSOM 与 SFOCBS 技术结合可能产生一种新的扫描探针显微镜,或者称之为扫描传感显微镜 (Scanning Sensing Microscopy, SSM)。这种能对样品同时进行光学与化学成像的技术将在化学、生物、医学和材料科学中占有重要地位。

(2) 生物分析和医学诊断的迅速发展对分析探头的微型化提出了更高的要求,以促进生物与医学研究尽快进入分子水平,因而使亚波长光纤传感探头在这些领域将显得愈来愈重要。各种各样具有高灵敏、高选择性和光学稳定性的染料体系已经被广为发现,基于这些体系的新的分子、离子的亚波长光纤传感探头将很快出现。结合酶化学、免疫化学的亚微米生物传感器也会很快涌现出来。

(3) 新的适于单分子检测的超针尖构成方法将成为研究的热点。各种各样的 MEM 将在不久的将来问世。

(4) 由于现有的各种光谱数据同样受到衍射极限限制,反映的结构信息也是在一定区间的平均值。基于 NSOM 的近场扫描光学光谱。反映的将是更为丰富、精细的局部亚结构信息,预计在这方面也会有较多的工作出现。

(5) 作为一门年轻的科学,近场光学在理论方面还显得较为幼稚,人们对新出现的发生在近场区的各种相互作用还不十分清楚,对近场吸收、近场激发、近场光电磁波的性质等方面的理论突破无疑会极大地推进这门技术在应用上的发展。

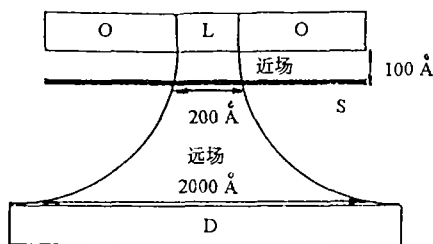


图1 近场光学成像原理

D——远场检测系统(如透镜), L——纳米光源  
O——遮光材料, S——样品

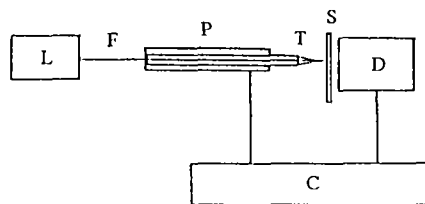


图2 NSOM的基本结构

L——激光光源, T——探针, F——光纤, S——样品  
P——压电管, D——检测器, C——计算机空间控制系统

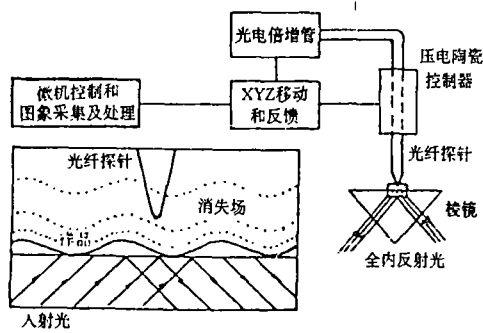


图3 PSTM示意图

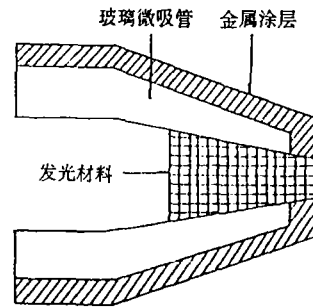


图4 微吸管激光主动光源

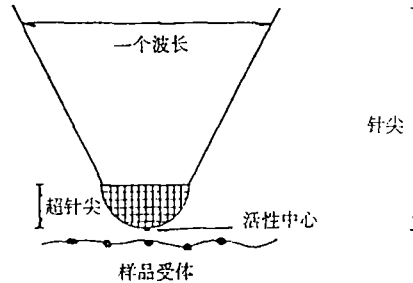


图5 MEM中超针尖与样品的相互作用

## 参 考 文 献

- [1] Binnig G, Rohrer H et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy. Phys. Rev. Lett., 1982, 49: 57.
- [2] 白春礼, 高广义. 扫描探针显微镜. 现代科学仪器, 1994, (4): 3.
- [3] Synge E H. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. Phil. Mag., 1928, 6: 356.
- [4] Lewis A, Isaacson M, Muray A et al. Development of a 500 Å spatial resolution light microscope, Ultramicroscopy, 1984, 13: 277.
- [5] Lewis A, Lieberman K, Near-field optical imaging with a nonevanesciently excited high-brightness light source of subwavelength dimensions. Nature, 1991, 354: 214.
- [6] Toledo-Crow R, Chen Y, Vaez-Iravani M. An atomic force regulated near field scanning optical microscope. SPIE Int. Soc. Opt. Eng., 1992, 1639: 44.
- [7] Lewis A, Betzig E, Harootunian A et al. "Near-field imaging of fluorescence" in "Spectroscopic membrane probes", Ed.: Loew L M, CRC Press, 1988, Vol. I: 81.
- [8] McDonald A. Electric and magnetic coupling through small apertures in shield walls of any thickness. IEEE Trans, 1972, MTT-20: 698.

- [9] Betzig E, Troutman J K, Harris T D et al. Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale. *Science*, 1991, **251**: 1468.
- [10] Reddick R C, Warmack R J, Chilcott D W et al. Photon scanning tunneling microscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 1990, **61**: 3669.
- [11] 郭宁, 吴世法, 夏德宽等. 光子扫描隧道显微镜的光电成像系统研究. *光学技术*, 1994, (3): 21.
- [12] Kopelman R, Tan W. Near-field optics; imaging single molecules. *Science*, 1993, **262**: 1382.
- [13] Perkins T T, Quake S R, Smith D E et al. Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science*, 1994, **264**: 822.
- [14] Perkins T T, Smith D E. Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain. *Science*, 1994, **264**: 819.
- [15] Kopelman R, Lewis A, Lieberman K. Subwavelength molecular optics; the world's smallest light source? *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1990, **183**: 333.
- [16] Tan W. Nanofabrication and applications of subwavelength optical probes: chemical and biological sensors, light sources and exciton probes, Ph. D. Thesis, The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan (1993).
- [17] Francis A H, Kopelman R. "Excitation dynamics in molecular solids" in "Laser Spectroscopy of Solids" Ed. : Yen W M and Seizer P M, Springer-Verlag, New York, 1981: 241.
- [18] Kopelman R, Lewis A, Lieberman K et al. Evanescent luminescence and nanometer-size light source. *J. Lumin.*, 1991, 48/49: 871.
- [19] Kopelman R, Langmore J, Orr B et al. Scanning Molecular Exciton Microscopy: A New Approach to Gene Sequencing, Human Genom Program Reports, U. S. Dept. of Energy, Washington DC, 1991/1992: 130.
- [20] Murray R W, Dessy R E, Heineman W R et al. Chemical Sensors and Microinstrumentation, AM. Chem. Soc., Washington, DC, (1989).
- [21] 王柯敏, 霍希琴. 光化学传感器. *应用基础与工程科学学报*, 1993, **1** (1), 10.
- [22] Barnard S M, Walt D R. A fibre-optic chemical sensor with discrete sensing sites. *Nature.*, 1991, **353**: 338.
- [23] Tan W, Shi Z-Y, Kopelman R. The development of submicron optical fiber chemical sensor. *Anal. Chem.*, 1992, **64**: 2985.
- [24] Tan W, Shi Z-Y, Smith S et al. Submicrometer intracellular chemical optical fiber sensors. *Science*, 1992, **258**: 778.
- [25] Kopelman R, Tan W. "Near-field optical microscopy, spectroscopy and sensors" in "Spectroscopic and Microscopic Imaging of the Chemical State", Ed: Morris M D, Marcel Dekker Inc., New York, 1993: 227.

## NEAR-FIELD OPTIC AND ITS APPLICATIONS

Wang Kemin     Tan Weihong

(*Department of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082*)

Bai Chunli

(*Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100080*)

**Abstract** This paper describes Near-field Scanning Optic Microscopy (NSOM), Molecular Exciton Microscopy (MEM), Submicrometer Fiber Optic Chemical and Biological Sensors (SFOCBS) and their applications, and prospects the bright future of these new technologies.

**Key words** near-field optic, near-field scanning optic microscopy, molecular exciton microscopy, submicrometer fiber optic chemical and biological sensors