

Микролинзовая микроскопия сверхвысокого разрешения

И. В. Яминский^{1,3,*}, С. А. Сенотрусова^{1,3,†}, А. И. Ахметова^{2,3,‡}

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра физики полимеров и кристаллов. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова факультет биоинженерии и биоинформатики Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

³ООО НПП «Центр перспективных технологий». Россия, 119311, Москва, ул. Строителей, 4-5-47 (Поступила в редакцию 20.05.2022; подписана в печать 10.06.2022)

Оптическая микроскопия является одним из самых распространенных и удобных методов получения изображения образца без его сложной предварительной обработки, при этом в реальном времени и с разрешением, недоступным человеческому глазу. Однако разрешающая способность любого современного обычного оптического микроскопа ограничена дифракционным пределом, который в видимом свете составляет около 200 нм. Чтобы увеличить ее, а также преодолеть данное ограничение, предлагается использовать микролинзы. Микролинза — оптическая линза микронного размера, позволяющая получить изображение за счет «захвата» световых волн в ближнем поле, отраженных от предмета. Располагаясь между образцом и объективом микроскопа, микролинза является оптическим усилителем, повышающим разрешающую способность микроскопа. В предлагаемой работе приведены результаты экспериментов по преодолению дифракционного предела в оптической микроскопии с помощью использования микролинз в обычном оптическом микроскопе.

Использование оптической микроскопии с микролинзами открывает новые возможности для получения изображений бактерий, вирусов, ДНК и биомолекул с подробным изучением их структуры в реальном времени.

PACS: 42.70.-a.

УДК: 53.082.532.

Ключевые слова: микролинзовая микроскопия, оптическая микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Разрешающая способность современных обычных оптических микроскопов имеет ограничение, накладываемое дифракцией. Актуальна задача визуализации в оптический микроскоп с преодолением дифракционного предела, которая активно решается с помощью микролинзовой микроскопии.

Микроскопия с разрешением, превышающим этот предел, способна оказать большое влияние на множество приложений в науках о жизни и материалах, поэтому она стала предметом интенсивных исследований. Для улучшения разрешающей способности были предложены различные методы, основанные на ближнепольной оптической микроскопии [1], молекулярной флуоресценции [2, 3], с использованием плазмонных структур [4, 5], и метаматериалов [6]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения. Например, при использовании флуоресцентных микроскопов с введением в изучаемые объекты белковых молекул, светящихся при воздействии ультрафиолета, трудно реализовывать окрашивание вирусов на практике. С помощью сканирующей ближнепольной оптической микроскопии можно получать растровые изобра-

жения с разрешением ниже дифракционного предела, но минус данного способа заключается в том, что он довольно медленный.

Основное преимущество предлагаемого метода с использованием микролинз заключается в том, что с его помощью можно реализовать изучение как внешнего вида вирусов, бактерий и других биологических объектов, так и топологии микро- и наноструктур. Микролинза представляет собой оптическую линзу, позволяющую получить изображение за счет «захвата» световых волн в ближнем поле, отраженных от предмета. Она фокусирует падающий свет в световое пятно и передает изображение ближнего поля контактирующего с линзой объекта в мнимое изображение, которое визуализируется в объективе оптического микроскопа [7]. Таким образом, располагаясь между образцом и объективом микроскопа, микролинза является оптическим усилителем, повышающим разрешающую способность микроскопа.

В работе приведены результаты исследований с использованием прозрачных микролинз из таких материалов, как BaTiO₃ (диаметром от 20 мкм до 100 мкм), TiO₂ (диаметром от 10 до 60 мкм) и полиметилкрилата (диаметром 9 мкм). Исследования проводились и на воздухе, и в иммерсионной среде в режиме реального времени.

Перспектива использования оптической микроскопии с микролинзами заключается в возможности визуализации бактерий, вирусов, биомолекул в ре-

* yaminsky@nanoscopy.ru

† sofsen@mail.ru

‡ assel1505@yandex.ru

альном времени в жидкой и воздушной средах.

1. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Оптическая микроскопия — значительное достижение в истории науки, она использует видимый свет для наблюдения объектов микронных масштабов. Однако существует ограничение, которое не позволяет увидеть два объекта, расположенных друг от друга ближе определенного значения расстояния — дифракционный предел [8]. Он выражается по формуле

$$d = 0.61\lambda/NA,$$

где NA — числовая апертура объектива, а λ — длина волны источника света, которым освещается образец.

В современной науке предпринимаются многочисленные попытки преодолеть дифракционный предел, чтобы получать изображения со сверхразрешением и изучать объекты в нанометровом масштабе. Например, использование твердых иммерсионных линз, а также ближнепольная микроскопия с использованием различных структур (микросфер, цилиндрических микролинз). Последний из перечисленных способов получил название «микролинзовая оптическая микроскопия». Впервые использование данного метода было продемонстрировано командой исследователей из Манчестерского университета под руководством Зенгбо Вана [9]. Микросферы (или микролинзы) из SiO_2 с показателем преломления $n = 1.46$ и диаметром от 2 до 9 мкм размещаются на поверхности исследуемого объекта. В качестве источника проходящего белого света используется галогенная лампа, длина волны испускаемого света составляет 600 нм. Микросфера рассматривается как канал, соединяющий затухающую волну в ближнем поле и распространяющуюся волну в дальнем поле: она собирает информацию об объекте в ближнем поле, увеличивает ее, формируя виртуальные изображения, сохраняющие ту же ориентацию, что и объекты в дальнем поле, и затем собирает ее с помощью обычной линзы объектива $\times 80$ (числовая апертура (NA) используемого объектива Olympus MD Plan равна 0.9). В качестве образца использовалась сетчатая мембрана из анодного оксида алюминия с золотым покрытием, на которую нанесены микросферы диаметром 4.74 мкм. Диаметр пор составляет 50 нм, и они расположены на расстоянии 50 нм друг от друга. Оптический микроскоп с микросферами (оптический наноскоп) позволяет увидеть эти крошечные поры, хотя их размеры гораздо меньше дифракционного предела. Использование сферических микролинз обеспечивает разрешение от $\lambda/8$ ($\lambda = 400$ нм) до $\lambda/14$ ($\lambda = 750$ нм) в видимом диапазоне спектра. Также в этом исследовании был проведен эксперимент в режиме отраженного света: в качестве образцов использовался Blu-ray диск. Ширина дорожек записи диска составляет 200 нм, расстояние между ними 100 нм, что меньше дифракционного предела. В качестве источника света

использовалась галогенная лампа. Внутри микролинзы наблюдалось четкое изображение дорожек.

Увеличенное изображение, даваемое микролинзой, возникает из-за эффекта фотонных наноструй (ФНС). Когда микросфера освещается световым пучком, на теневой стороне микросферы генерируется узкий интенсивный, не затухающий и низко расходящийся оптический пучок, похожий на струю. Такая наноструя может преодолеть дифракционный предел в оптической микроскопии, а сигнал, генерируемый в ближнем поле вблизи теневой поверхности, все еще может быть собран в дальнем поле [10, 11].

Факторами, которые могут влиять на свойства ФНС, являются размер сферы, длина волны, коэффициент преломления сферы, коэффициент преломления среды, числовая апертура объектива и др. [12].

Визуализация объектов с помощью микролинз может происходить в двух режимах: с использованием жидкой среды и в сухом режиме. Было обнаружено, что при использовании иммерсионных жидкостей в комбинации с микролинзовой микроскопией также получается достичь суперразрешения. Было проведено исследование, в котором авторы работы использовали три вида жидкостей: воду, 40%-ый сахарный раствор и иммерсионное масло [13], в которые погружались микросферы из титаната бария. В качестве образца использовался Blu-ray диск с дорожками шириной 100 нм. Сравнивая полученные результаты, исследователи обнаружили, что изображения дорожки были увеличены микросферой во всех трех средах. Увеличенное изображение полос диска четко наблюдались в трех различных средах с микросферой, при этом без микросферы эти полосы не были видны. Различные среды давали разное увеличение: увеличение в воде, 40%-ном растворе сахара и иммерсионном масле микроскопа Leica было экспериментально определено как 3.3–3.8 раза, 2.5–3.0 раза и 2.0–2.5 раза соответственно. Периодические линии 120 и 180 нм диска Blu-ray были четко увеличены в воде и в 40% растворе сахара.

При использовании иммерсионной жидкости на получаемое увеличение и разрешение влияет относительный показатель преломления, определяемый как

$$n = n_2/n_1,$$

где n_1 — показатель преломления среды, а n_2 — показатель преломления микросферы. Более высокий относительный показатель преломления может дать большее увеличение, что позволит получить лучшее разрешение. Это справедливо только до $n = 1.8$. Иммерсионная жидкость может обеспечить сверхразрешение при $n < 1.8$ микросферы. Когда положение плоскости изображения было близко к поверхности образца, оптическое увеличение уменьшалось. С другой стороны, когда плоскость изображения располагалась значительно ниже поверхности образца, наблюдалось большее увеличение. Однако не во всех положениях изображения имели хороший контраст.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения увеличенного изображения микролинзовым методом в настоящей работе использовались микросферы из BaTiO_3 диаметром от 30 до 100 мкм, собственный показатель преломления материала линз составляет 1.9. В комбинации с силиконовым маслом ПМС-200, относительный показатель преломления составляет 1.36. Также использовались микросферы из полиметилакрилата (ПМА) диаметром 9 мкм, собственный показатель преломления которых составляет 1.49. Все полученные изображения обрабатывались в программном обеспечении для анализа изображений FemtoScan Online.

2.1 Измерения с дифракционной решеткой

Ранее уже были проведены измерения с микросхемой центрального процессора [14]. В данной работе в качестве образца была выбрана рельефная дифракционная решетка на металлизированном термопластике с известным периодом и размерами структур. Период решетки составляет 800 нм, ширина щелей 300 нм. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Микролинзы располагаются сверху на поверхности образца.

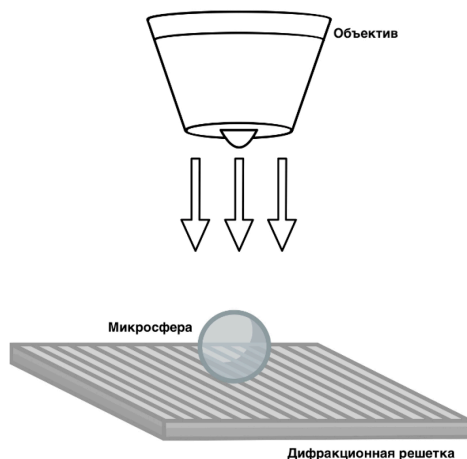


Рис. 1. Схема наблюдения увеличенного изображения структуры решетки в режиме отраженного света

При использовании микролинзы из BaTiO_3 диаметром 70 мкм, погруженной в силиконовое масло, полученное увеличение составило 2.4. В другом измерении для получения изображения поверхности дифракционной решетки была использована микролинза из полиметилакрилата диаметром 11 мкм. Увеличение, даваемое микролинзой, оказалось равным 2. Полученные изображения представлены на рис. 2.

Таким образом, применение линз из титаната бария в комбинации с силиконовым маслом позволяет получать большее разрешение, чем в случае микролинзы из полиметилакрилата на воздухе.

2.2. Измерения с красными кровяными клетками

В качестве «живого» образца были выбраны красные кровяные клетки. Почти весь переносимый кровью кислород связан с гемоглобином эритроцитов, поэтому роль этих клеток сложно недооценить.

Изучение эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии позволяет получить изображения с нанометровым разрешением, но контактный характер исследования может вызвать неустранимые структурные повреждения или деформацию морфологии образца. В частности, силы взаимодействия могут заставить осевшие клетки отделиться от поверхности подложки во время сканирования. Силовое воздействие кантилевера на клетку может вызывать повреждение, что ограничивает возможность многократного использования зонда и потенциально способствует перекрестному загрязнению. Поэтому особый интерес представляет наблюдение эритроцитов с помощью микролинзовой оптической микроскопии без повреждения образца.

Для получения увеличенного изображения эритроцитов был приготовлен образец: в буфере Аллена был растворен образец крови в соотношении 1 мкл крови на 500 мкл буфера. Состав и методика приготовления буфера были взяты из работы [15]. Концентрация не должна быть слишком высокой, чтобы можно было наблюдать одиночные клетки. После приготовления образца на чашку Петри помещались микросферы титаната бария, а сверху наносилась капля полученного раствора.

Интерес представляет наблюдение динамической трансформации эритроцита в эхиноцит в связи с изменением концентрации вещества в капле буфера в процессе ее высыхания. Эхиноцит — форма эритроцита, который имеет аномальную клеточную мембрану, характеризующуюся множеством мелких, равномерно расположенных колючих выступов — шипов. Поверхность эритроцита приобретает интересный для рассмотрения рельеф. Были получены изображения с различных стадий превращения эритроцита, полученных по времени, они представлены на рис. 3. Первая стадия — начальное состояние, вторая стадия — спустя 70 минут.

Таким образом, благодаря использованию оптического микроскопа с микросферами, можно изучать особенности поверхности клеток крови. На рис. 4 на изображении В отчетливо видны шипы эхиноцита, в то время как в области без микросферы видны только контуры клеток.

В результате были получены увеличенные изображения клеток: средний размер эритроцита составляет около 7 мкм, размер увеличенного изображения — 14.5 мкм. Увеличение, даваемое микролинзой титаната бария диаметром 52 мкм, составило 2.07.

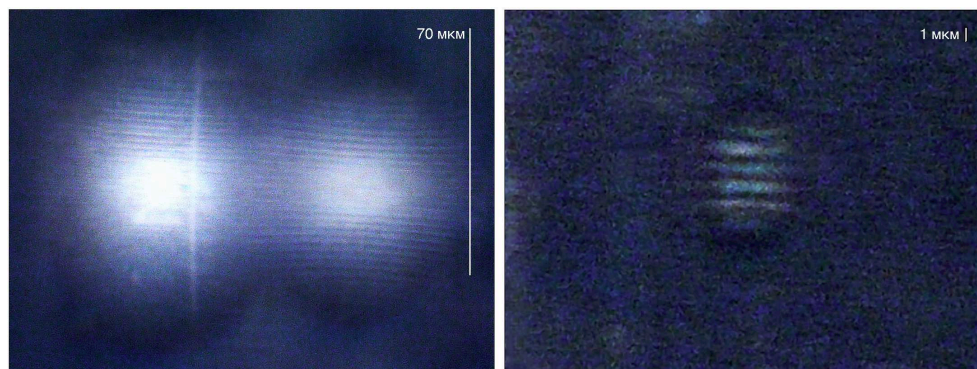


Рис. 2. Увеличенные изображения рельефной дифракционной решетки. Период решетки 800 нм, ширина щелей 300 нм. (А) Увеличенное изображение через микросферы ВаТiОз в силиконовом масле. Увеличение составляет 2.4. Фокус располагается на 7 мкм над поверхностью образца. (Б) Увеличенное изображение через микросферы полиметилакрилата. Увеличение составляет 2.01. Фокус располагается на 1 мкм над поверхностью образца

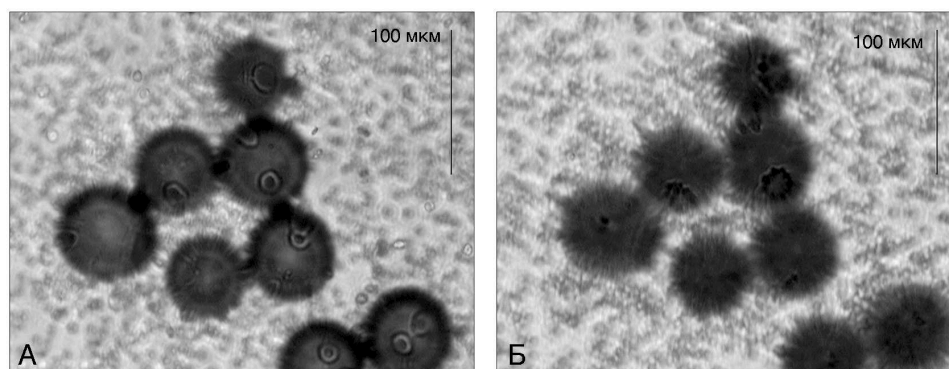


Рис. 3. Изображения различных стадий трансформации эритроцитов. Увеличение объектива 40х. (А) Начальная стадия. (Б) Состояние эритроцитов через 70 минут: превращение в эхиноциты

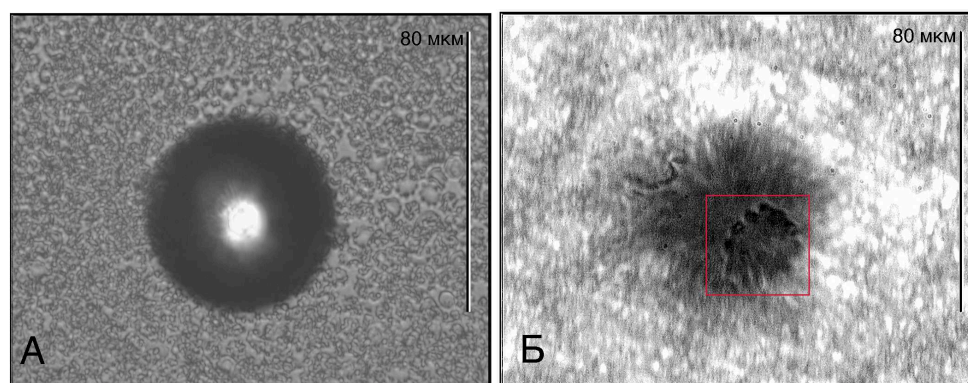


Рис. 4. Визуализация эхиноцита спустя 70 минут. Диаметр микролинзы составляет 52 мкм. Увеличение объектива 40х. (А) Фокус находится на поверхности образца. (Б) Фокус находится на изображении эхиноцита. Отчетливо видны шипы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микросферная оптическая микроскопия позволяет достигать новые возможности для получения изображений биологических объектов, таких как клетки, бак-

терии, вирусы, ДНК и биомакромолекулы с подробным изучением их внутреннего устройства в реальном времени в воздухе и в иммерсионной среде. Метод прост в реализации, применим в условиях освещения белым

светом, в жидкости и на воздухе, а образцы не требуют сложной предварительной обработки. Получая мнимые изображения с помощью микролинз, можно преодолеть естественное ограничение оптических микроскопов — дифракционный предел, и изучать структуры менее 200 нм.

В данной работе были экспериментально реализованы методы микролинзовой оптической микроскопии. Были проведены эксперименты в различных режимах: на воздухе и в иммерсионной среде, в режимах проходящего и отраженного света. В качестве образцов исследовались: рельефная дифракционная решетка на

метализированном термопластике с периодом структур 800 нм и шириной щелей 300 нм; структурные особенности эритроцитов по мере превращения в эхиноциты с наблюдением процесса в реальном времени.

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику кафедры общей физики физического факультета МГУ В.В. Попову за предоставление образца дифракционной решетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества № 21-58-10005, Фонда содействия инноваций (проект №71108, договор 0071108) и Российского научного фонда (проект № 20-12-00389).

-
- [1] Hecht B., Sick B., Wild U.P., Deckert V., Zenobi R., Martin O.J.F., Pohl D.W. // *J. Chem. Phys.* 2000. **112**, N 18. P. 7761.
- [2] Betzig E. // *Rev. Mod. Phys.* 2000. **87**, N 4, P. 1153.
- [3] Kratz J., Geisler C., Egner A. // *Opt. Exp.* 2022. **30**, N 2, P. 939.
- [4] Willets K.A., Wilson A.J., Sundaresan V., Joshi P.B. // *Chem. Rev.* 2017. **117**, N 11, P. 7538.
- [5] Piaskowski J., Ibragimov A., Wendisch F.J., Bourret G.R. // *J. Phys.Chem. C.* 2021. **125**, N 50, P. 27661.
- [6] Kim M., Rho J. // *Nano Converg.* 2015. **2**, N 22.
- [7] Krivitsky L., Wang J., Wang Z., Luk'yanchuk B. // *Sci Rep.* 2013. **3**, N 3501.
- [8] Betzig E., Trautman J.K., Harris T.D., Weiner J.S., Kostelak R.L. // *Science.* 1991. **251**. P. 1468.
- [9] Wang Z., Guo W., Li L., Luk'yanchuk B., Khan A., Liu Z., Chen Z., Hong M. // *Nat. Commun.* 2011. **2**, P. 218.
- [10] Itagi A. V., Challener W.A. // *J. Opt. Soc. Am.* 2005. **22**, P. 2847.
- [11] Chen Z., Taflove A., Backman V. // *Opt. Express.* 2004. **12**, P. 1214.
- [12] Upputuri P.K., Wen Z.-B., Wu Z., Pramanik M. // *J. Biomed. Opt.* **19**, N 11. P. 116003.
- [13] Lee S. et al. // *Appl. Opt.* 2013. **52**. P. 7265.
- [14] Яминский И.В., Ахметова А.И., Сенотрусова С.А. // *Наноиндустрия.* 2021. **14**, N 3–4. С. 22.
- [15] Макарова Е.С., Яминский И.В. // *Медицина и высокие технологии.* 2016. **1**. С. 39.
-

Ultra-high resolution microlens microscopy

I.V. Yaminsky^{1,3,a}, S.A. Senotrusova^{1,3,b}, A.I. Akhmetova^{2,3,c}

¹*Physics of Polymers and Crystals Department, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University
Moscow 119991, Russia*

²*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia*

³*Advanced Technologies Center, Moscow, 119311, Russia*

E-mail: ^ayaminsky@nanoscopy.ru, ^bsofsen@mail.ru, ^cassel1505@yandex.ru

Optical microscopy is one of the most widely used and convenient methods of imaging samples without complex real-time preprocessing, with a resolution not available to the human eye. However, the resolution of any modern conventional optical microscope is limited by the diffraction limit, which is about 200 nm in visible light. To increase it, and to overcome this limitation, a microlens is proposed. A microlens is an optical lens that produces an image by 'capturing' light waves in the near field reflected from an object. Positioned between the specimen and the microscope objective, the microlens is an optical amplifier that enhances the resolution of the microscope. This paper presents the results of experiments on overcoming the diffraction limit in optical microscopy by using microlenses in a conventional optical microscope.

The use of optical microscopy with microlenses opens up new possibilities for imaging bacteria, viruses, DNA and biomacromolecules with a detailed study of their structure in real time.

PACS: 42.70.-a.

Keywords: microlens microscopy, optical microscopy.

Received 20 May 2022.

Сведения об авторах

1. Яминский Игорь Владимирович — доктор физ.-мат. наук, профессор, ген. директор Центра перспективных технологий; email: yaminsky@nanoscopy.ru.
2. Сенотрусова Софья Андреевна — студент, инженер; email: sofsen@mail.ru.
3. Ахметова Ассель Иосифовна — инженер, вед. специалист; email: assel1505@yandex.ru.