

高分辨率表面等离子体显微镜综述

蔡浩原

(中国科学院电子学研究所 传感技术国家重点实验室, 北京 100190)

摘要: 本文对表面等离子体显微镜的原理、架构和应用进行了综述, 指出表面等离子体显微镜技术的未来发展方向是着力提高横向分辨率, 接近光学衍射极限, 以及发展与电化学、力学等微纳操纵手段结合的表面等离子体显微镜, 形成微纳尺度下显微成像和操纵的闭环测量路径。

关键词: 表面等离子体显微镜; 细胞粘附; 免标记; 生物传感器; 表面等离子体图像

中图分类号: TP394.1; TH691.9 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/CO.20140705.0691

Review of high resolution surface plasmon microscopy

CAI Hao-yuan

(*State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Electronics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

* *Corresponding author, E-mail: hycail@mail.ie.ac.cn*

Abstract: In this paper, major developments in Surface Plasmon Microscope (SPM) technology are reviewed. Theory, experiment setup and application examples are presented. Two SPM technology trends, i. e., enhancing lateral resolution close to optical diffraction limit and combining with electrochemical/mechanical micro/nano manipulation methods, are suggested and discussed.

Key words: surface plasmon microscope; cell adhesion; label-free; biosensor; surface plasmon resonance imaging

1 引言

表面等离子体(Surface Plasmons, SP)是金属表面的自由电子非均匀分布的一种表现。自由电子在金属表面形成正、负电荷的密度分布,在这些正、负电荷的密度分布中,就形成了一种沿金属表面传播的电磁波,被称为表面等离子体波(Surface Plasmon Wave, SPW)。SPW一方面沿金属表面传播,另一方面以指数衰减的形式,穿透金属表面的介质约数百纳米,因此,它对金属表面的折射率变化非常敏感,理论上能达到 10^{-7} 折射率单位(Refractive Index Unit, RIU)^[1]。

当符合一定条件的入射光与SPW发生强烈耦合时,大部分的入射光能量被SPW吸收,转化为热量,此时金属表面的反射光变得很弱,这种现象被称为表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)。SPR生物传感器通过测量SPR条件的变化,可以检测发生在金属表面的生物分子相互作用,具有免标记、高灵敏度和实时响应的特点。基于SPR原理的生物传感技术已经被广泛的应用于免疫、食品、环境和纳米材料等多个研究领域^[2-3]。

表面等离子体显微镜(Surface Plasmon Microscopy, SPM)是一种能够获取微观的表面等离子体共振图像的光学显微装置。它综合了表面等离子体传感器的高灵敏度和显微镜的高分辨率的优点,是研究细胞行为特性和纳米材料界面的尖端工具。早期的SPM是基于经典的Kretschmann结构,在出射端加装显微光路实现的^[4-5]。基于类似的光学架构, Giebel搭建了一套用于观察活细胞/基质界面的SPM,验证了利用SPM获取单细胞SPR图像的可行性,并首次利用该装置获得细胞片足区与基底之间的距离((25 ± 10) nm)^[6]。然而,基于棱镜架构的SPM的横向分辨率较低,上述系统约为 $12 \mu\text{m}$,远远大于光学显微镜的分辨率(约200 nm)。

造成棱镜架构SPM的横向分辨率较差的原因主要有:(1)要获得高分辨率,需要使用大数值孔径(Numerical Aperture, NA)的显微物镜,然而,

NA越大,物镜镜头距离被测样品的距离越短,而棱镜的物理尺寸限制了采用大NA显微物镜;(2)当光入射角度发生变化时,被照射的区域也在发生移动,棱镜结构无法将光路固定在一个微小的区域内;(3)SPW在金属表面的传播,会引起相邻两个点的SPR图像的互相干扰。SPW的波长直接决定了SPM横向分辨率的高低。

近年来,越来越多的科研人员尝试利用SPM技术去开展表面科学的研究,例如细胞在功能性表面的粘附特性,纳米颗粒在不同性质表面的动力学过程等。与原子力显微镜(AFM),荧光显微镜等技术相比,SPM技术的最引人注目之处在于它可以免标记地研究界面之间的相互作用。然而,横向分辨率是SPM技术在科研中发挥更大作用的一个瓶颈,如何使SPM也能接近传统光学显微镜的分辨能力,是一个非常关键的技术问题。近年来,这一瓶颈已经通过各种技术手段得到解决,SPM的横向分辨率已接近光学显微镜的衍射极限(约200 nm)^[7]。基于高分辨率SPM的高水平研究成果被陆续发表^[8-15]。

本文将对SPM技术的发展进行综述。首先介绍SPM的工作原理、技术瓶颈和主要的光学架构,然后着重介绍近年来开展的一些应用实验成果,最后讨论SPM技术的未来发展方向。

2 SPM的原理

为了更好地理解SPM技术,首先介绍SPM成像的物理学原理。如前所述,SPR现象发生在金属和介质的界面上,由于SPW的传播波矢 k_{sp} 大于入射光在真空中的波矢 k_{in} ,因此,必须要借助棱镜耦合才能满足SPR的共振条件(图1):

$$k_x = k_{\text{in}} \cos(\theta) = k_{\text{sp}}, \quad (1)$$

式中: k_x 是入射光波矢 k_{in} 在X方向上的投影。

由式(1)可知,为满足共振条件,可以通过改变入射光的角度 θ 或者波长 λ 。当满足共振条件时,反射光强会出现一个最小值,对应的入射角度或波长被称为共振角 θ_{spr} 或共振波长 λ_{spr} 。

2.1 SPW的传播长度

如图1所示,SPW会沿着X方向在金属表面

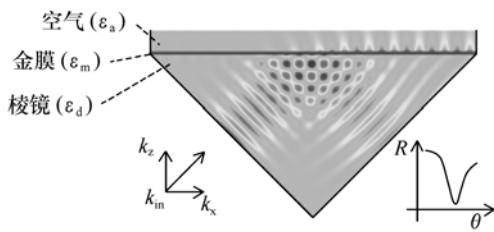


图 1 典型的 Kretschmann 棱镜 SPR 耦合结构的模拟结果。P 偏振的入射光经过棱镜耦合斜入射在金膜表面。图中显示的是磁场 H_y 分量

Fig. 1 Simulation result of a typical Kretschmann SPR excitation method. P-polarized light incidents the gold surface coupled by a prism. Magnetic H_y components are shown on the plot

传播,SPR 图像的横向分辨率与 SPW 的传播长度直接相关。设想在金属表面的两个相邻的微粒,他们的距离为 L ,当 L 小于 SPW 的传播长度 PL 时,微粒 1 对 SPW 的扰动会波及微粒 2(图 2)。这就是 SPW 传播长度决定 SPR 图像横向分辨率的原因。

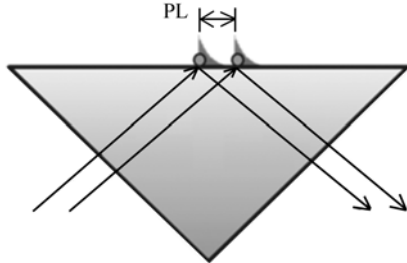


图 2 SPW 的传播以及它对 SPR 成像分辨率的影响示意图

Fig. 2 Propagation of SPW and its effect on SPR image resolution

SPW 可以用以下方程描述:

$$E_x(x, z, t) = \begin{cases} E_{z0} \exp[i(k_x x - \omega t)] \exp(-|k_{z0}|z) & (z > 0) \\ E_{z1} \exp[i(k_x x - \omega t)] \exp(-|k_{z1}|z) & (z < 0) \end{cases} \quad (2)$$

SPW 沿着 X 方向传播,波矢为 k_x ,在 Z 方向上,它的振幅按指数衰减。根据 Maxwell 方程,波矢 k_x 可以表示为:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d} \right)^{1/2}, \quad (3)$$

式中: ϵ_m 是金属的介电常数, ϵ_d 是介质的介电常数。由于 ϵ_m 是一个复数,相应的, k_x 也可表达成为:

$$k_{xr} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_{mr} \epsilon_d}{\epsilon_{mr} + \epsilon_d} \right)^{1/2}, \quad (4)$$

$$k_{xi} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_{mi} \epsilon_d}{\epsilon_{mi} + \epsilon_d} \right)^{3/2} \frac{\epsilon_{mi}}{2(\epsilon_{mi})^2}. \quad (5)$$

SPW 在传播过程中,它的强度按照 $e^{-2k_{xi}x}$ 指数衰减,SPW 的传播长度(PL)定义为强度衰减到 $1/e$ 时的距离:

$$PL = (2k_{xi})^{-1}. \quad (6)$$

对于波长为 650 nm 的入射光而言,金 (Au) 和银 (Ag) 的传播长度分别为 $4.7 \mu\text{m}$ 和 $46.5 \mu\text{m}$ 。可以看出,为了达到高分辨率的 SPM,例如达到 $1 \mu\text{m}$ 的水平,首先传播长度 PL 就必须小于 $1 \mu\text{m}$ 。

2.2 显微物镜的数值孔径

高数值孔径 (Numerical Aperture, NA) 的显微物镜是高分辨率 SPM 图像的另一个重要条件,它决定了显微系统的细节分辨能力。在显微光学中, NA 描述了物镜接收入射光线的锥形角:

$$NA = n \sin(\theta), \quad (7)$$

式中, n 代表物镜周围介质的折射率(例如,浸油物镜所使用的矿物油为 1.52), θ 代表进入物镜的光线的最大锥形角的一半。对于光学系统而言,它的最佳分辨能力由下式定义:

$$\Delta d = \lambda / 2NA. \quad (8)$$

因此,对于可见光光学显微镜,它的显微分辨能力约为 200 nm。

2.3 棱镜型 SPM 的分辨能力瓶颈

自从 Kretschmann 提出棱镜耦合的 SPR 激发方式以来^[16],这一方法已经被广泛应用于 SPR 的仪器中。Homola. J 对此进行了详细的综述^[17]。基于棱镜的 SPR 仪器能够获得非常高的折射率分辨率 (5×10^{-7} RIU)。很自然的,研究者们会提出基于棱镜的 SPM,并由 Wolfgang Knoll 最早实现^[5]。

下面简单分析一下棱镜型 SPM 的工作原理(图 3(a))。P 偏振的光源被透镜准直后,经棱镜耦合照射在金属膜上,反射光在棱镜的另一侧出射,被显微光路收集,成像于 CCD 照相机上。为了满足 SPR 的条件,入射和出射光路一般对称的放置于棱镜两侧的扫描臂上,并需要根据需要,研究者们提出了各种角度扫描的机械方式^[6,18]。Giebel 等人搭建了一套棱镜型 SPM 系统,用于观察活细胞与基底的接触。为了方便对比,把同一区域的光学显微镜图像和 SPM 图像放在一起进行对比(图 3(b),图 3(c))。从图上可见,图 3(c)显示的 SPM 图像在 X 方向上基本上不能分辨,其原因正是因为 SPW 的传播长度太长(约 22 μm ,银,波长 633 nm)。为了提高 SPR 图像的分辨率,利用具有较大吸收系数的铝作为金属膜的材料,获得了接近 3 μm 的分辨率(图 3(d))。

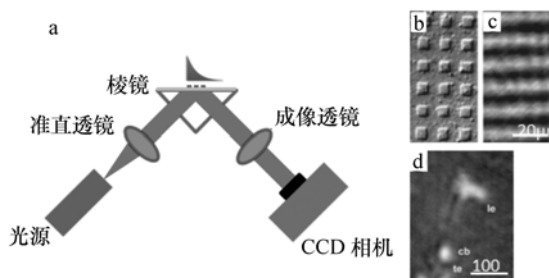


图 3 棱镜型 SPM^[6]。(a)结构示意图;(b)银膜样品的光学显微镜图像;(c)相应的 SPM 图像;(d)铝膜基底上活的金鱼胶质细胞的 SPM 图像

Fig. 3 Prism-based SPM^[6]. (a) Typical structure of prism-based SPM. (b) Optical microscope image of a silver test structure. (c) SPM image of the same structure. (d) SPM image of living goldfish oligodendrocyte on an aluminum substrate.

显然,这样的分辨率与光学显微镜的性能相比相差甚远。对于棱镜型 SPM 而言,主要的瓶颈在于:(1)棱镜的物理尺寸限制了高数值孔径显微物镜的采用;(2)由于采用的是斜入射方式,图像会发生变形。要提高 SPM 的图像分辨率,需要从以下 3 个方面着手:(1)缩短 SPW 的传播长度;(2)采用高数值孔径显微物镜;(3)满足 SPR 的激

发条件。近年来,已经出现了数种高分辨率 SPM 的架构,下面对这些不同的架构进行介绍和讨论。

3 高分辨率 SPM 的典型架构

对高分辨率 SPM 而言,它应该能够满足 SPR 的激发条件的同时,达到或者接近传统光学显微镜的分辨率。一个典型的高分辨率 SPM 架构如图 4 所示。它通常采用倒置式显微镜的结构,并采用高数值孔径的显微物镜。准直后的 P 偏振光经过分束器入射到物镜中,随后被聚焦到金属膜上,相应的,反射光被物镜收集,经过分束器后,成像在 CCD 相机上。

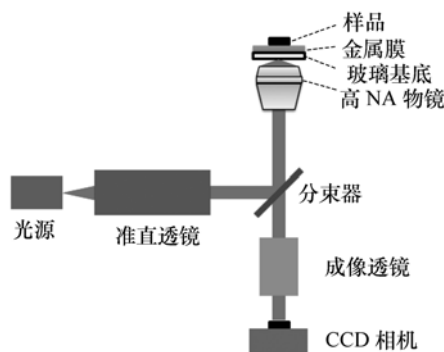


图 4 显微物镜型 SPM 的结构示意图

Fig. 4 Typical schematic diagram of SPM based on objective

由于棱镜型 SPM 很难应用高数值孔径的显微物镜,Kano 等人首次实现直接利用浸油物镜激发 SPR^[19]。折射率为 1.51 的匹配油介质扮演了与棱镜类似的波矢增强角色。由于物镜的聚焦作用,聚焦到金属膜上的入射光角度范围从 0° 至 80° ,涵括了水溶液($n = 1.33$)的 SPR 共振角度,从而实现了 SPR 现象的激发。因此,物镜数值孔径对 SPM 的分辨率限制被克服,这种形式的 SPM 被称为显微物镜型 SPM。

根据成像光路的不同,显微物镜型 SPM 可以分为两种类型:(1)宽场照明 SPM 和(2)扫描型 SPM。对于宽场照明 SPM 而言,大约几十乘几十微米的区域被入射光均匀照明,反射光被物镜收集后,直接成像于 CCD 相机;而对于扫描型 SPM

而言,高轴对称性的入射光被物镜会聚到金属膜上,并在金属膜表面形成一个约 200 nm 的 SPR 局域电场。这一局域电场大大减少了 SPW 传播长度对 SPR 成像分辨率的影响,从而使得 SPM 达到传统光学显微镜的高分辨率成为可能。CCD 相机捕捉每一点的 FFT 图像,并演算出该点对应的折射率。因此,扫描型 SPM 必须要通过一个 XY 扫描机制来获得高分辨率的 SPR 图像。

3.1 宽场照明 SPM

宽场照明 SPM (Wide-field SPM, WSPM) 均匀地照亮成像区域,具有成像速度快,光路结构简单的优点。按照照明光路的不同,又可细分为两种类型。第一种为斜入射型 WSPM (图 5(a))。入射光首先被聚焦到显微物镜的后焦平面上,经过物镜的整形后,以平行光的形式斜入射到金属膜的表面,被反射后,对称的从另一侧被物镜接收,并成像于 CCD 相机上^[20]。由此看出,物镜和匹配液在这里取代棱镜的耦合作用,然而,SPW 的传播长度仍然对 SPR 图像分辨率有决定性的影响。

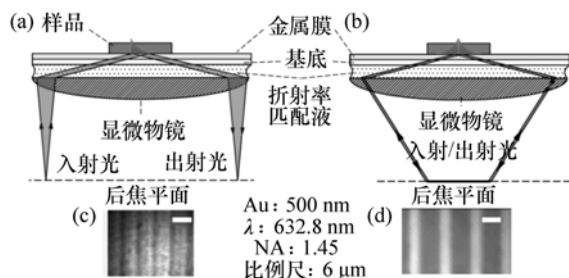


图 5 两种宽场照明 SPM 的比较^[20-21]。(a)斜入射型 WSPM 的示意图;(b)轴对称型 WSPM 的示意图;(c)斜入射型 WSPM 的 SPM 图像;(d)轴对称型 WSPM 的 SPM 图像。在(c)和(d)中间,列出了它们的实验条件。

Fig. 5 Comparison of two types of WSPM^[20-21]. (a) Oblique incident WSPM. (b) axial symmetry SPM. (c) SPM image of oblique incident WSPM. (d) SPM image of axial symmetry WSPM. Experiment conditions are shown in the middle of (c) and (d).

为了克服这一缺点,Stabler. G 等人引入了另

一种 WSPM,可称为轴对称型 SPM^[21]。与第一种方式不同的是,在物镜的后焦平面上成像的不仅是一个点,而是一个圆环。从物镜中出射的光包括了一定范围的方位角,因此,金属膜上的每一个点都被均匀照射,而且 SPW 都是轴对称的传播,他们之间的相互干涉,使得同样的在成像区域上的每一个点都形成了类似的局域 SPW 区域,这样就消除了 SPW 的传播对 SPR 图像造成的影响。图 5(c)和图 5(d)分别显示了斜入射型和轴对称型 SPM 在相似条件下获得的 SPR 图像。显然,轴对称型 SPM 能够获得更高分辨率的 SPR 图像。

由于高数值孔径的物镜非常昂贵,Zhang. J. 等人尝试使用固体浸没透镜来搭建高分辨率的 SPM^[22]。通过使用一个相对较为廉价的 0.42NA (Mitutoyo, Japan) 物镜和一个消球差的固体浸没透镜 (S-LaH79 玻璃),他们获得了一个有效数值孔径为 1.67 的物镜。利用该物镜,观察到了空气中和水中的蛋白质单层膜的 SPR 图像。

3.2 扫描型 SPM

与棱镜型 SPM 相比,宽场照明 SPM 能够显著提高 SPR 图像的分辨率。然而,由于 SPW 的影响,它仍然无法达到衍射极限,也就是说亚微米的分辨率。

Knoll 等人提出了一种扫描型 SPM,以实现更高的分辨率^[23]。如图 5 所示,高数值孔径的物镜将入射的平行光会聚到金属膜表面,由于入射光的轴对称特性,会聚的入射光互相干涉,最终在金属膜的表面形成一个直径约 200 nm 的 SPR 局域电场。这一局域电场可以 SPR 成像的探针,通过 CCD 相机捕捉每一点的 FFT 图像,演算出该点的折射率。通过一个二维的 XY 扫描机制,逐点扫描获得分辨率接近 200 nm 的 SPR 图像。

基于此架构,Knoll 对沉积在金属银膜表面的 LB 膜厚度进行了测量^[19],并获得了 1.5 μm 微球的 SPR 图像。需要指出的是,扫描型 SPM 的折射率灵敏度与传统的 ATR 棱镜 SPR 仪器相比要差近 3 个数量级,只有约 2×10^{-3} RIU^[23]。这一现象造成的原因也与 SPW 的传播长度缩短有关。

为了获得更好的图像对比度, M. G. Somekh 在二维扫描机构上增加了 Z 方向的移动机制, 他们发现当样品稍微偏移焦点 $1 \mu\text{m}$ 左右时, 图像的对比度(折射率灵敏度)会得到改善。与前述的利用 FFT 图像演算折射率不同, 他们通过检测干涉条纹的强度来计算折射率, 这一改进机构的图像分辨率与光学显微机构相当, 图像对比度也进一步增强^[24-25]。为了降低光学机构的复杂度, B. Zhang 等人提出采用一种共聚焦光学系统来实现扫描型 SPM^[26], 如图 6 所示。

尽管扫描型 SPM 的图像分辨率比宽场照明 SPM 的要高, 由于采用了扫描机制, 其图像获取速率要慢得多。为了综合这二者的优点, M. G. Somekh 提出了一种宽场干涉 SPM, 既提高了图像获取速率, 也保持了扫描 SPM 的高分辨率^[27]。K. Watanabe 等人则提出了一种可切换的宽场和扫描 SPM 的显微机构(图 7), 通过采用一套翻转反射镜 FM1 和 FM2, 实现了两种机构的集成。利用该切换机构, 在观察细胞时, 可以先利用宽场

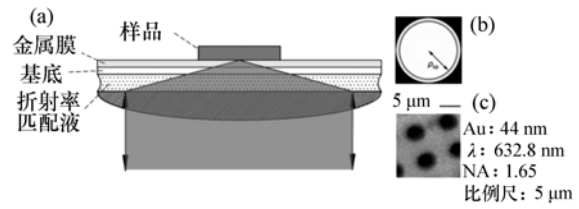


图 6 扫描型 SPM^[7]。(a) 结构示意图; (b) 显微镜物镜后焦平面上的光强分布模拟计算结果, 黑色的圆环表示 SPR 对光的吸收; (c) 利用该装置获得的磷脂膜的有限折射率分布图像。

Fig. 6 Scanning SPM^[7]. (a) Schematic diagram of SSPM. (b) Calculated intensity distribution of the reflected light at the exit pupil plane of the objective lens. The dark ring represents SPR phenomenon. (c) Effective refractive index distribution of the patterned lipid bilayer observed by the SSPM.

SPM 机构观察整个细胞的外形, 然后切换至扫描 SPM 机构观察单个细胞的片足区的细节^[28]。

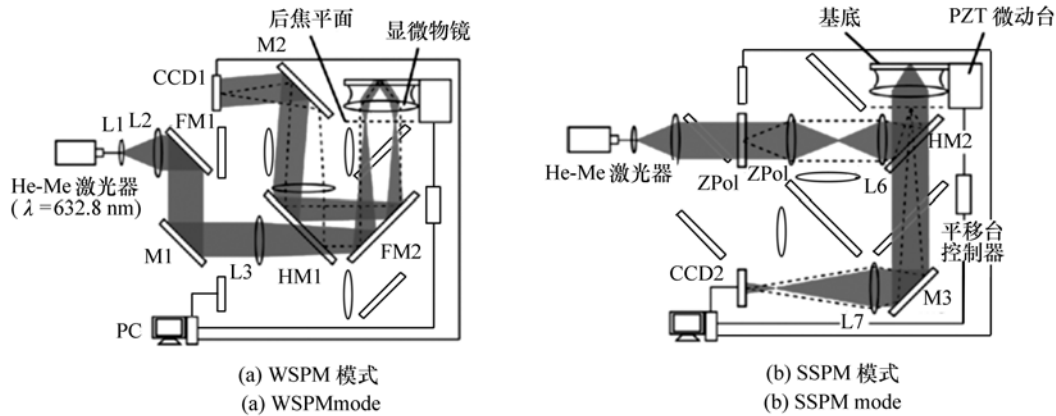


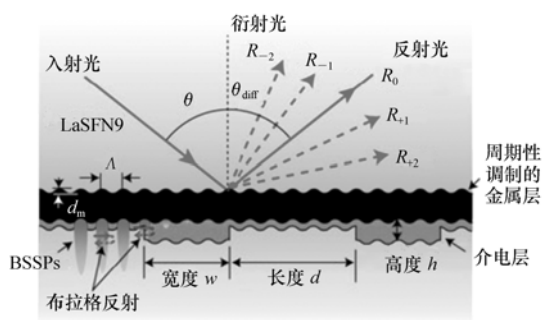
图 7 可切换的宽场/扫描 SPM^[28]

Fig. 7 Optical systems of switchable WSPM/SSPM^[28]

3.3 纳米结构金属膜

通过改造 SPR 金属膜, 在其表面制备出周期性的纳米结构, 可以调整 SPW 的传播长度, 从而实现高分辨率 SPR 图像的目标。M. Toma 等人提出一种周期性的纳米结构金属膜, 可实现布拉格散射的表面等离子体波(Bragg-Scattered Surface

Plasmon, BSSP)^[29]。该纳米结构金属膜具有周期性的正弦波结构, 波长为 280 nm , 深度 d_m 为 20 nm (图 8)。与在平面金膜表面传播的 SP 相比, BSSP 具有相当的传播长度, 因此保证了高的折射率灵敏度^[30-31]; 另一方面, BSSP 又具有高度的局域特性, 有助于提高成像的横向分辨率^[32]。

图8 周期性纳米金属膜结构示意图^[29]Fig. 8 Schematic diagram of the nanostructure metal film^[29]

4 SPM 的应用

4.1 细胞与表面的相互作用

研究细胞在不同性质表面上的行为差异是许多生物现象的一个基本研究内容,例如细胞的生长、分化、凋亡、肿瘤转移和受伤响应等^[30-31]。在生化实验室中,荧光显微镜是研究这些生物过程的常用手段之一,然而,为了观察细胞,需要对细胞进行染色、荧光标记和固定化等,这些过程或者是有细胞毒性,或者会由于荧光漂白现象,无法实现长时间观察。高分辨率 SPM 可以为细胞行为观察提供一个长期、免标记和高灵敏度的实验手段。

M. M. A. Jamil 和 M. G. Smoekh 应用研制的宽场 SPM 首次对人永生表皮 (HaCaT) 细胞进行长时间的活体观测^[9]。通过使用数值孔径为 1.45 和 1.65 的显微物镜,他们分别观测了空气中和水中的 HaCaT 细胞的 SPM 图像,获得了亚微米的细胞图像。即使不使用标记技术,也能够很清楚的分辨细胞的片足区和丝足区。

自 2010 年以来,Shan 和 Wang 等人发表了一系列的利用高分辨率 SPM 研究细胞行为的文章。他们在 B. Huang 的 SPM 结构上加以改造^[20],增加了电化学模块^[8]。利用此装置(图 9),他们获得了高分辨率($0.2 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$)的电化学图像和高灵敏度的电化学电流(0.3 pA),与扫描电化学显微镜相比(SECM),电化学 SPM 无需微电极扫

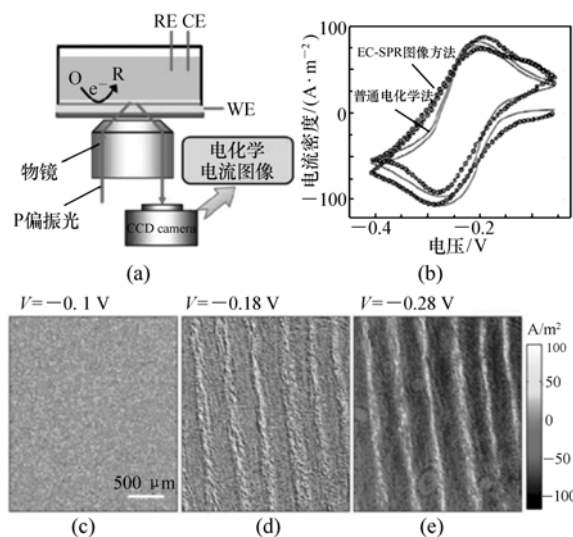


图9 (a) EC-SPM 的结构示意图^[8]。图中 RE, CE 和 WE 分别代表参比电极、对电极和工作电极; (b) 利用电化学工作站(红线)和 EC-SPM(圆环)获得的裸金膜上的循环伏安曲线。(c, d, e) 循环伏安扫描过程中,不同电压下对应的 EC-SPM 图像。电压扫描速度为 0.1 V/s 。

Fig. 9 (a) Schematic illustration of an electrochemical current imaging technique, where RE, CE, and WE are reference, counter, and working electrodes, respectively. (b) Cyclic voltammograms measured by the conventional electrochemical method (red line) and by the electrochemical current imaging technique (open circles) of a bare gold electrode. (c, d, e) Electrochemical current images of a fingerprint at different potentials recorded during continuous cycling of the electrode potential between 0.10 V and 0.28 V at a rate of 0.1 V/s .

描,而且速度更快。Wang 等人又开发了电化学阻抗 SPM,并研究了细胞凋亡和电穿孔等细胞的生命活动过程,电阻抗灵敏度达到约 2 pS ^[15]。另外,还尝试了施加渗透压变化等刺激手段,研究外界刺激对细胞的粘附的影响^[10]。这一系列的研究结果表明,高分辨率 SPM 与电学、力学等手段结合,可以为细胞行为研究提供一个全新的高分辨率、免标记和长时间的监测手段。

4.2 纳米材料特性表征

除了用于细胞行为研究,电化学 SPM 也被应

用于纳米颗粒的电催化特性研究^[12]。 1.6×10^5 个铂纳米粒子的电催化反应过程被同时记录和分类,并获得某单个纳米颗粒的循环伏安曲线和电催化电化学电流。A. R. Halpern 利用 SPM 实时观察了固定在纳米颗粒上的 DNA 分子的杂交过程。该实验观察了单个聚乙烯微球和金纳米颗粒之间的由于 DNA 分子杂交引起的吸附过程。这一研究表面 SPM 可以用于生物功能纳米颗粒的性能研究。

K. Watanabe 等人利用扫描型 SPM 观测了磷脂膜的高分辨率图像,图像的横向分辨率达到 170 nm,厚度分辨率为 0.33 nm,折射率灵敏度为 1×10^{-3} RIU^[7]。T. Roland 等人采用一个外差式干涉 SPM 来辨识亚波长的纳米颗粒,直径在 10 ~ 200 nm 区间^[14]。这些结果表明 SPM 是可视化研究纳米材料(如多聚物、凝胶、大分子和生物材料)的有力工具。

5 结束语

经过近 20 年的发展,SPM 已经在分辨率上取得了很大的进展,扫描型 SPM 的分辨率性能已经可以与传统的光学显微镜相当。同时,SPM 以其免标记、长时间监测、高灵敏度等优点,在细胞行为研究和纳米材料特性表征方面展示了优异的能力。尽管如此,SPM 在以下方面还需获得改进,

以满足科研的需要。

(1) 在提高分辨率的同时,保持折射率灵敏度。目前 SPM 的最佳横向分辨率已经达到近 200 nm^[7],然而,与此对应的折射率灵敏度仅为 4×10^{-4} RIU,比棱镜型 SPR 仪器要差 2 ~ 3 个数量级^[4, 17]。从理论上分析,分辨率和折射率灵敏度是一对矛盾,要想进一步提高 SPM 的折射率灵敏度,需要对 SPM 的成像原理做严格的理论分析。M. G. Smoekh 的 $V(z)$ 函数分析提供了一条可能的思路。

(2) 对金属膜纳米加工微调 SPW 的传播。除了改进 SPM 的光学系统以外,光子晶体和布拉格散射金属表面都是对金属膜表面进行纳米加工,以实现 SPW 的调控。SPW 能够被限制在一个 280 nm 左右的周期性空间中,以驻波的形式存在,这也是提高分辨率的同时保持折射率灵敏度的另外一种重要思路,而且还可以采用较低数值孔径的显微物镜,从而降低光路复杂度和造价。

(3) SPM 与其他表面刺激/操控手段相结合。如前所述,SPM 尤其适合应用于表界面相互作用的实验研究,例如细胞粘附等,并已经取得丰富的研究成果。我们相信通过将 SPM 与电学、电化学、AFM、和力学等外界刺激/操控手段结合,会使其成为一套闭环的反馈系统,从而在细胞/纳米材料特性研究中获得更多有趣的结果。

参考文献:

- [1] RAETHER H. *Surface plasmons on smooth surfaces*[M]. Berlin:Springer Press,1988.
- [2] HOMOLA J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species[J]. *Chemical Reviews*, 2008,108(2):462-493.
- [3] LIEBERG B, NYLANDER C, LUNSTR M I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing[J]. *Sensors and Actuators*, 1983,4:299-304.
- [4] YEATMAN E M. Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 1996,11(6):635-649.
- [5] ROTHENH USLER B, KNOLL W. Surface plasmon microscopy[J]. *Nature*, 1988,332(6165):61.
- [6] GIEBEL K, BECHINGER C, HERMINGHAUS S, *et al.*. Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy[J]. *Biophys J.*, 1999,76(1 Pt 1):509-516.
- [7] WATANABE K, MIYAZAKI R, TERAKADO G, *et al.*. High resolution imaging of patterned model biological membranes by localized surface plasmon microscopy[J]. *Appl. Opt.*, 2010,49(5):887-891.
- [8] SHAN X, PATEL U, WANG S, *et al.*. Imaging local electrochemical current via surface plasmon resonance[J]. *Science*, 2010,327(5971):1363-1366.

- [9] JAMIL M M, DENYER M C, YOUSEFFI M, *et al.*. Imaging of the cell surface interface using objective coupled widefield surface plasmon microscopy[J]. *J. Struct. Biol.*, 2008, 164(1):75-80.
- [10] WANG W, WANG S, LIU Q, *et al.*. Mapping single-cell-substrate interactions by surface plasmon resonance microscopy [J]. *Langmuir*, 2012, 28(37):13373-13379.
- [11] WANG W, YANG Y, WANG S, *et al.*. Label-free measuring and mapping of binding kinetics of membrane proteins in single living cells[J]. *Nature Chem.*, 2012, 4(10):846-853.
- [12] SHAN X, D EZ-P REZ I, WANG L, *et al.*. Imaging the electrocatalytic activity of single nanoparticles[J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(10):668-672.
- [13] HALPERN A R, WOOD J B, WANG Y, *et al.*. Single-nanoparticle near-infrared surface plasmon resonance microscopy for real-time measurements of DNA hybridization adsorption[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(1):1022-1030.
- [14] ROLAND T, BERGUIGA L, ELEZGARAY J, *et al.*. Scanning surface plasmon imaging of nanoparticles[J]. *Physical Review B*, 2010, 81(23):235419.
- [15] WANG W, FOLEY K, SHAN X, *et al.*. Single cells and intracellular processes studied by a plasmonic-based electrochemical impedance microscopy[J]. *Nature Chemistry*, 2011, 3(3):249-255.
- [16] KRETSCHMANN E. The determination of the optical constants of metals by excitation of surface plasmons [J]. *z. Phys.*, 1971, 241(4):313-324.
- [17] HOMOLA J, YEE SS, GAUGLITZ G. Surface plasmon resonance sensors: review[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, 54(1):3-15.
- [18] LIU C, CUI D, LI H. A hard soft microfluidic-based biosensor flow cell for SPR imaging application[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26(1):255-261.
- [19] KANO H, KNOLL W. Locally excited surface-plasmon-polaritons for thickness measurement of LBK films [J]. *Optics Communications*, 1998, 153(4):235-239.
- [20] HUANG B, YU F, ZARE R N. Surface plasmon resonance imaging using a high numerical aperture microscope objective [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(7):2979-2983.
- [21] STABLER G, SOMEKH M G, SEE C W. High-resolution wide-field surface plasmon microscopy[J]. *J. Microsc.*, 2004, 214(Pt 3):328-333.
- [22] ZHANG J, PITTER MC, LIU S, *et al.*. Surface-plasmon microscopy with a two-piece solid immersion lens: bright and dark fields[J]. *Appl. Opt.*, 2006, 45(31):7977-7986.
- [23] KANO H, KNOLL W. A scanning microscope employing localized surface-plasmon-polaritons as a sensing probe[J]. *Optics Communications*, 2000, 182(1):11-15.
- [24] SOMEKH M G, LIU S G, VELINOV T S, *et al.*. Optical $V(z)$ for high-resolution 2π surface plasmon microscopy[J]. *Opt. Lett.*, 2000, 25(11):823-825.
- [25] SOMEKH M G, LIU S, VELINOV T S, *et al.*. High-resolution scanning surface-plasmon microscopy [J]. *Appl. Opt.*, 2000, 39(34):6279-6287.
- [26] ZHANG B, PECHPRASARN S, ZHANG J, *et al.*. Confocal surface plasmon microscopy with pupil function engineering [J]. *Opt. Express*, 2012, 20(7):7388-7397.
- [27] SOMEKH M G, STABLER G, LIU S, *et al.*. Wide-field high-resolution surface-plasmon interference microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 2009, 34(20):3110-3112.
- [28] WATANABE K, MATSUURA K, KAWATA F, *et al.*. Scanning and non-scanning surface plasmon microscopy to observe cell adhesion sites[J]. *Biomed Opt. Express*, 2012, 3(2):354-359.
- [29] TOMA M, KNOLL W, DOSTALEK J. Bragg-scattered surface plasmon microscopy: theoretical study [J]. *Plasmonics*, 2011:1-7.
- [30] BARNES W L, PREIST T W, KITSON S C, *et al.*. Photonic gaps in the dispersion of surface plasmons on gratings [J]. *Phys. Rev. B Condens Matter*, 1995, 51(16):11164-11167.

- [31] DOSTALEK J, ADAM P, KVASNI K A P, *et al.*. Spectroscopy of Bragg-scattered surface plasmons for characterization of thin biomolecular films[J]. *Opt. Lett.*, 2007, 32(20):2903-2905.
- [32] LINDQUIST N C, LESUFFLEUR A, IM H, *et al.*. Sub-micron resolution surface plasmon resonance imaging enabled by nanohole arrays with surrounding Bragg mirrors for enhanced sensitivity and isolation[J]. *Lab. Chip.*, 2009, 9(3):382-387.
- [33] BOUDREAU N, JONES P. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come[J]. *Biochem. J.*, 1999, 339:481-488.
- [34] BARCZYK M, CARRACEDO S, GULLBERG D. Integrins[J]. *Cell and Tissue Research*, 2010, 339(1):269-280.

作者简介:



蔡浩原(1977—),男,广西桂平人,博士,副研究员,1998年于清华大学获得学士学位,2003年于中国科学院电子学研究所获得博士学位,主要从事微纳传感器及分析仪器方面的研究。E-mail:hycai@mail.ie.ac.cn