

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102735878 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201210209374. 5

(22) 申请日 2012. 06. 25

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 章海军 李甸 张冬仙 王淑莹

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 张法高

(51) Int. Cl.

G01Q 60/06(2010. 01)

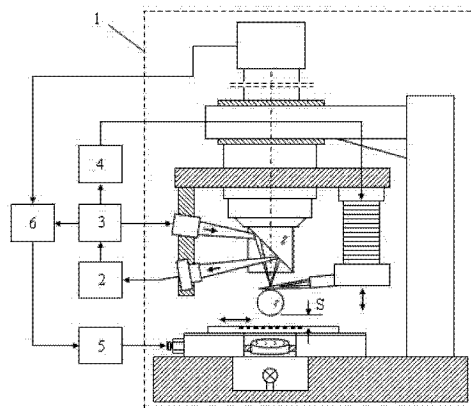
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法及系统

(57) 摘要

本发明公开了一种基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法及系统。它具有由微悬臂与微球组合探针、压电陶瓷、激光器、半透半反棱镜、位置敏感元件、步进移动台、物镜、CCD 等组成的超分辨显微成像装置,以及由电流电压转换器、反馈控制模块、高压放大器、步进控制器、计算机及接口等组成的控制系统。采用微悬臂与微球组合探针将微球抬离而又十分逼近样品表面的方法及采用基于原子力的微纳米反馈控制方法,将微球—样品间距控制在近场范围,实现超分辨光学显微成像。本发明的优点是:提出基于微悬臂—微球探针的超分辨显微成像新方法,实现样品的多区域、全视场、超分辨光学显微成像,突破光学衍射极限,克服了传统微球显微成像技术在诸多等方面的局限性。



1. 一种基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法,其特征在于采用微悬臂与微球组合探针将微球抬离样品表面的方法及采用基于原子力的微纳米反馈控制方法,引入原子力显微镜的微悬臂,制备出微悬臂—微球探针,将微球抬离同时又十分逼近样品表面;引入激光器、半透半反棱镜、位置探测器及压电陶瓷等,通过微纳米反馈控制将微球—样品间距控制在近场范围,突破 200nm 的光学衍射极限,实现样品的超分辨光学显微成像;配合步进移动台,实现微球与样品之间的横向调节,克服传统微球显微成像方法在微球只是随机播撒在样品表面、易污染和损伤样品、放大倍率与分辨率较低、只能对微球正下方的孤立区域显微成像等方面的局限性,实现微纳米样品的多区域、全视场、超分辨率光学显微成像。

2. 一种基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像系统,其特征在于包括成像装置(1)和光信号检测及电路控制回路,成像装置(1)包括微球(7)、微悬臂(8)、样品(9)、半透半反棱镜(10)、物镜(11)、接筒(12)、镜筒(13)、CCD(14)、微悬臂座(15)、压电陶瓷(16)、垫块(17)、安装块(18)、激光器(19)、位置探测器(20)、步进移动台(21)、步进电机(22)、开孔(23)、聚光镜(24)、光源(25)、灯框(26)、支架(27)、横梁(28)、三角块(29)、立柱(30)、底座(31);

微球(7)与微悬臂(8)构成的微悬臂与微球组合探针,通过微悬臂座(15)安装在压电陶瓷(16)下端,压电陶瓷(16)上端通过垫块(17)固定在安装块(18)上,安装块(18)与物镜(11)固定在一起,半透半反棱镜(10)、物镜(11)、接筒(12)、镜筒(13)、CCD(14)顺次装配,并通过接筒(12)安装在横梁(28)上,横梁(28)通过三角块(29)固定在立柱(30)上,立柱(30)安装在底座(31)上,激光器(19)与位置探测器(20)固定在支架(27)上,支架(27)固定在安装块(18)上,样品(9)安装在步进移动台(21)上,由步进电机(22)驱动,步进移动台(21)中间有一开孔(23),开孔(23)内部安装有聚光镜(24),步进移动台(21)安装在底座(31)上,光源(25)安装在底座(31)的灯框(26)内;

光信号检测及电路控制回路包括电流电压转换器(2)、PID 反馈控制模块(3)、高压放大器(4)、步进驱动模块(5)、计算机及接口(6);

PID 反馈控制模块(3)分别与电流电压转换器(2)、高压放大器(4)、计算机及接口(6)相连,步进电机(22)、步进驱动模块(5)、计算机及接口(6)顺次相连,计算机及接口(6)与 CCD(14)相连,PID 反馈控制模块(3)与激光器(19)相连,电流电压转换器(2)与位置探测器(20),高压放大器(4)与压电陶瓷(16)相连。

基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法及系统

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法及系统。

背景技术

[0002] 自 1764 年列文虎克发明第一台光学显微镜以来,光学显微镜就一直是应用数量最多、应用领域最广的显微成像工具。1874 年,阿贝提出显微镜的光学衍射极限约为 200nm 左右,即光学显微镜最高只能获得约 200nm 的分辨率。为了克服这一衍射极限,人们发明了一系列其他类型的显微镜技术,包括透射电子显微镜(TEM)、扫描电子显微镜(SEM)、扫描隧道显微镜(STM)、原子力显微镜(AFM)、扫描近场光学显微镜(SNOM)等,并逐渐发展形成了扫描探针显微镜(SPM)家族。虽然 SEM、TEM、STM、AFM 和 SNOM 等具有纳米级乃至原子级的分辨率,但是,SEM 和 TEM 需要在真空下工作,无法适用于活体样品的现场观察;STM 则要求样品具有导电性;AFM 虽然可以实现导体与非导体的扫描成像,但它与 SNOM 一样,获得的是经过光电转换和电学放大的重建图像,而不是实时与直接观察到的图像。因此,就实时性、直接性及普适性而言,光学显微成像仍有不可替代的优越性。

[0003] 近年来,国际上研究者对超分辨光学显微成像技术开展了研究,其中较典型的是在样品表面随机播撒微球而对样品进行超分辨显微成像的技术,其特点是可以直接获得样品的实时显微图像,而且分辨率能够突破光学衍射极限。不过,这一技术至少在几个方面尚存在明显的局限性:首先,在原理上,微球播撒在被观察样品表面,微球下端面与样品面之间的纵向距离为零,即样品位于微球焦点之内较远距离处,显然,此时的微球透镜的成像放大倍率较小,因为在焦点范围以内,样品越靠近焦点,放大倍率越大,因此,为了获得更高的放大率和分辨率,需要将微球抬高样品面一定距离,而不是将微球播撒在样品表面;其次,在方法上,现有的微球播撒方式是随机的,完全无法控制其播撒的区域,也即无法有意识地对感兴趣的样品区域有效地进行显微观察,而只能随机地观察到撒有微球的样品表面区域,因此现有技术方法很难实用化;此外,虽然微球本身是球形的,但由于其直径较小($2\sim 10\mu\text{m}$),仍然较为锋利,因此,当微球只是随机播撒在样品表面时,不可避免地会对样品表面造成损伤,同时,播撒在样品表面的微球很难再清理干净,因而还会对样品造成污染。

[0004] 总之,随着科学技术朝着尺寸更小、容量更大及速度更快的方向延伸,特别是随着微纳米技术的各个领域的快速发展,迫切需要研究和发展的新的光学超分辨显微成像方法和技术;就微球显微成像技术而言,则需要在原理、方法和技术等方面不断拓展及创新,从而为实际应用提供技术基础。

[0005] 为此,本发明提出了基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法,发展和建立了基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像系统。采用基于微悬臂—微球探针将微球抬高而又十分逼近样品表面的方法,以及采用基于微球—样品间原子力作用机制的微纳米反馈控制方法,将微球—样品间距控制在近场范围,配合二维步进移动台,首次实现微纳米样品的多区域、全视场、超分辨光学显微成像。本发明的基于微悬臂—微球探针的超分辨显微成像方法及系统,克服了现有微球显微成像技术的上述局限性,为发展真正意义上

的微球超分辨显微成像技术及实际应用提供了新途径。

发明内容

[0006] 本发明的目的是突破常规光学显微镜的衍射极限,并克服现有微球显微成像技术在微球只是随机播撒在样品表面、易损伤和污染样品、放大倍率与分辨率较低、只能对微球正下方的孤立区域显微成像等方面的局限性,提供一种基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法及系统。

[0007] 基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法是:采用微悬臂与微球组合探针将微球抬离样品表面的方法及采用基于原子力的微纳米反馈控制方法,引入原子力显微镜(AFM)的微悬臂,制备出微悬臂—微球探针,将微球抬离同时又十分逼近样品表面;引入激光器、半透半反棱镜、位置探测器及压电陶瓷等,通过微纳米反馈控制将微球—样品间距控制在近场范围,突破 200nm 的光学衍射极限,实现样品的超分辨光学显微成像;配合步进移动台,实现微球与样品之间的横向调节,克服传统微球显微成像方法在微球只是随机播撒在样品表面、易污染和损伤样品、放大倍率与分辨率较低、只能对微球正下方的孤立区域显微成像等方面的局限性,实现微纳米样品的多区域、全视场、超分辨率光学显微成像。

[0008] 基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像系统包括成像装置和光信号检测及电路控制回路,成像装置包括微球、微悬臂、样品、半透半反棱镜、物镜、接筒、镜筒、CCD、微悬臂座、压电陶瓷、垫块、安装块、激光器、位置探测器、步进移动台、步进电机、开孔、聚光镜、光源、灯框、支架、横梁、三角块、立柱、底座;

微球与微悬臂构成的微悬臂与微球组合探针,通过微悬臂座安装在压电陶瓷下端,压电陶瓷上端通过垫块固定在安装块上,安装块与物镜固定在一起,半透半反棱镜、物镜、接筒、镜筒、CCD 顺次装配,并通过接筒安装在横梁上,横梁通过三角块固定在立柱上,立柱安装在底座上,激光器与位置探测器固定在支架上,支架固定在安装块上,样品安装在步进移动台上,由步进电机驱动,步进移动台中间有一开孔,开孔内部安装有聚光镜,步进移动台安装在底座上,光源安装在底座的灯框内;

光信号检测及电路控制回路包括电流电压转换器、PID 反馈控制模块、高压放大器、步进驱动模块、计算机及接口;

PID 反馈控制模块分别与电流电压转换器、高压放大器、计算机及接口相连,步进电机、步进驱动模块、计算机及接口顺次相连,计算机及接口与 CCD 相连,PID 反馈控制模块与激光器相连,电流电压转换器与位置探测器,高压放大器与压电陶瓷相连。

[0009] 本发明首次提出基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法,制备出微悬臂与微球组合探针,将微球抬离同时又十分逼近样品表面;首次通过微纳米反馈控制将微球—样品间距控制在近场范围,突破光学衍射极限,实现样品的超分辨光学显微成像;配合步进移动台,实现微球与样品之间的横向调节,克服传统微球显微成像方法在微球只是随机播撒在样品表面、污染和损伤样品、放大倍率与分辨率较低、只能对微球正下方的孤立区域显微成像等方面的局限性,实现微纳米样品的多区域、全视场、超分辨率光学显微成像。

附图说明

[0010] 图 1 是基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像系统结构示意图;

图 2 是本发明的成像装置示意图；

图 3 是微悬臂—微球探针的放大结构及其与样品之间的横向（水平位置）和纵向（间距 S）调节控制示意图；

图中：成像装置 1、电流电压转换器 2、PID 反馈控制模块 3、高压放大器 4、步进驱动模块 5、计算机及接口 6、微球 7、微悬臂 8、样品 9、半透半反棱镜 10、物镜 11、接筒 12、镜筒 13、CCD14、微悬臂座 15、压电陶瓷 16、垫块 17、安装块 18、激光器 19、位置探测器 20、步进移动台 21、步进电机 22、开孔 23、聚光镜 24、光源 25、灯框 26、支架 27、横梁 28、三角块 29、立柱 30、底座 31。

具体实施方式

[0011] 基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法是：采用微悬臂与微球组合探针将微球抬离样品表面的方法及采用基于原子力的微纳米反馈控制方法，引入原子力显微镜（AFM）的微悬臂，制备出微悬臂—微球探针，将微球抬离同时又十分逼近样品表面；引入激光器、半透半反棱镜、位置探测器及压电陶瓷等，通过微纳米反馈控制将微球—样品间距控制在近场范围，突破 200nm 的光学衍射极限，实现样品的超分辨光学显微成像；配合步进移动台，实现微球与样品之间的横向调节，克服传统微球显微成像方法在微球只是随机播撒在样品表面、易污染和损伤样品、放大倍率与分辨率较低、只能对微球正下方的孤立区域显微成像等方面的局限性，实现微纳米样品的多区域、全视场、超分辨率光学显微成像。

[0012] 如图 1、2 所示，基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像系统包括成像装置 1 和光信号检测及电路控制回路，成像装置 1 包括微球 7、微悬臂 8、样品 9、半透半反棱镜 10、物镜 11、接筒 12、镜筒 13、CCD14、微悬臂座 15、压电陶瓷 16、垫块 17、安装块 18、激光器 19、位置探测器 20、步进移动台 21、步进电机 22、开孔 23、聚光镜 24、光源 25、灯框 26、支架 27、横梁 28、三角块 29、立柱 30、底座 31；

微球 7 与微悬臂 8 构成的微悬臂与微球组合探针，通过微悬臂座 15 安装在压电陶瓷 16 下端，压电陶瓷 16 上端通过垫块 17 固定在安装块 18 上，安装块 18 与物镜 11 固定在一起，半透半反棱镜 10、物镜 11、接筒 12、镜筒 13、CCD14 顺次装配，并通过接筒 12 安装在横梁 28 上，横梁 28 通过三角块 29 固定在立柱 30 上，立柱 30 安装在底座 31 上，激光器 19 与位置探测器 20 固定在支架 27 上，支架 27 固定在安装块 18 上，样品 9 安装在步进移动台 21 上，由步进电机 22 驱动，步进移动台 21 中间有一开孔 23，开孔 23 内部安装有聚光镜 24，步进移动台 21 安装在底座 31 上，光源 25 安装在底座 31 的灯框 26 内；

光信号检测及电路控制回路包括电流电压转换器 2、PID 反馈控制模块 3、高压放大器 4、步进驱动模块 5、计算机及接口 6；

PID 反馈控制模块 3 分别与电流电压转换器 2、高压放大器 4、计算机及接口 6 相连，步进电机 22、步进驱动模块 5、计算机及接口 6 顺次相连，计算机及接口 6 与 CCD14 相连，PID 反馈控制模块 3 与激光器 19 相连，电流电压转换器 2 与位置探测器 20，高压放大器 4 与压电陶瓷 16 相连。

[0013] 如图 3 所示，采用微纳米操纵等方法自行制备的微悬臂与微球组合探针，将微球 7 固定在微悬臂 8 外端的侧面，并将微球抬离而又十分逼近样品 9 的表面；在近场范围内，由于微球的“超透镜”效应，可以突破光学衍射极限，获得样品的超分辨图像，而且，由于微球

被微悬臂抬离样品表面(而不是随机播撒在样品表面),因此可获得更高的放大倍率及分辨率。需要指出,虽然微球固定在微悬臂外端的侧面,但由于微悬臂是V字形的稳定对称结构,因此在微球与样品间的原子力作用下,微悬臂主要发生上下偏转(而不是左右扭曲)。基于微球与样品间原子力作用及微悬臂的偏转量,即可通过反馈方法将微球—样品间距S控制在近场范围,从激光器19发出的激光,经半透半反棱镜10后聚焦到微悬臂8的外端,从微悬臂8反射的光束,再经半透半反棱镜10后照射到位置探测器20上形成反射光斑,由于微球—样品之间的原子力作用,微悬臂8外端发生偏转,使位置探测器20上的反射光斑位置发生改变,从而使输出光电流发生改变,电流电压转换器2将光电流转换成电压信号,根据这一电压信号的大小,PID反馈控制模块3与高压放大器4控制压电陶瓷16的Z向伸长或缩短,从而带动微悬臂8和微球7在Z向上升或下降,据此将微球—样品间距S控制在近场范围,突破衍射极限,用微球7作为“超透镜”,实现样品9的超分辨显微成像。与此同时,安装在步进移动台21上的样品9,可在计算机及接口6、步进驱动模块5与步进电机22的控制下,随步进移动台21相对于微球7作横向(XY平面)移动,并借助于微纳米反馈,始终将微球—样品间距S控制在近场范围,从而使样品9的不同区域都可由微球7实现超分辨显微成像,据此最终实现微纳米样品的多区域、全视场、超分辨率光学显微成像。

[0014] 总之,本发明的基于微悬臂与微球组合探针的超分辨显微成像方法及系统,采用微悬臂与微球组合探针将微球抬离而又十分逼近样品表面的方法,同时采用基于原子力的微纳米反馈控制方法,将微球—样品间距控制在近场范围,突破200nm的衍射极限,实现超分辨显微成像。本发明首次提出和实现基于微悬臂与微球组合探针的超分辨率光学显微成像方法,克服了传统微球显微成像方法在微球只是随机播撒在样品表面、易污染和损伤样品、放大倍率与分辨率较低、只能对微球正下方的孤立区域显微成像等方面的局限性,真正实现微纳米样品的多区域、全视场、超分辨率光学显微成像,为广泛的实际应用提供了新的方法与技术基础。

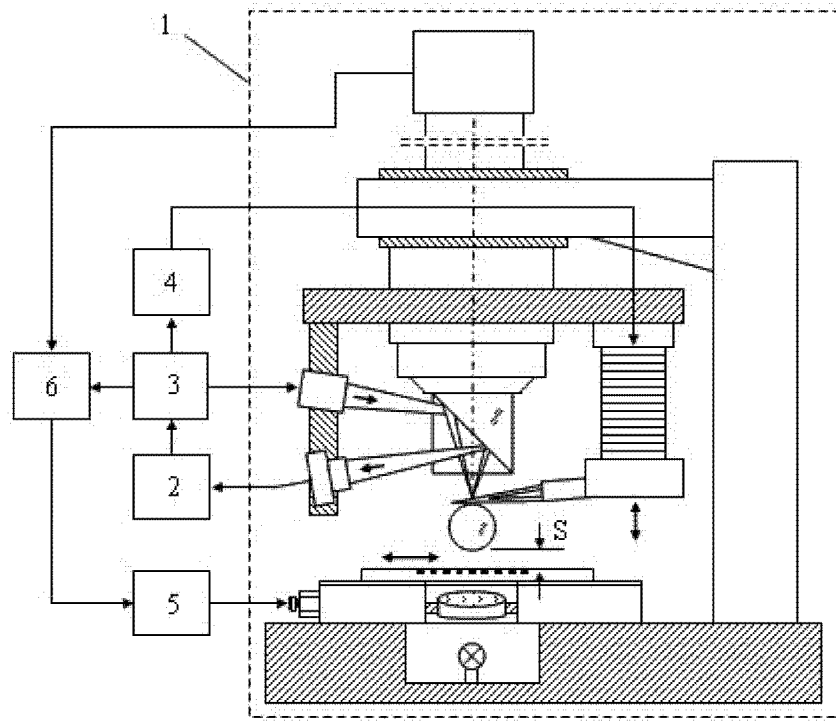


图 1

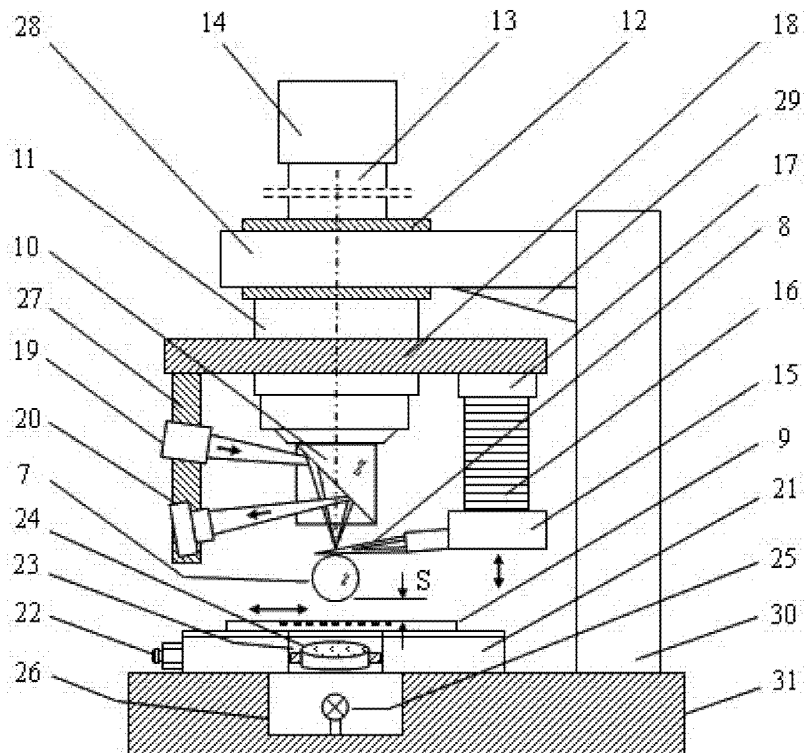


图 2

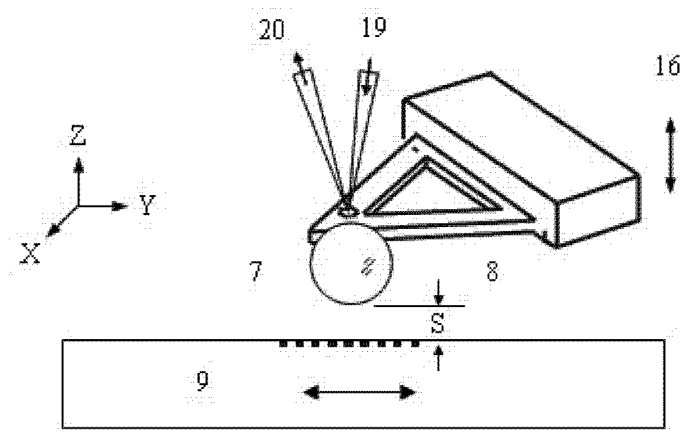


图 3