

Определение метрологических характеристик сканирующего ближнепольного оптического микроскопа при исследовании биологических объектов

Ф. В. БУЛЫГИН*, О. Е. ДРАЧЕВА*, Н. П. КУТУЗОВ**, В. Л. ЛЯСКОВСКИЙ*,
Г. В. МАКСИМОВ**, Ю. А. НИКОЛАЕВ**

* Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия, e-mail: o.dracheva@vniiofi.ru

** Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Предложены методы определения основных метрологических характеристик сканирующего ближнепольного оптического микроскопа — масштабного коэффициента и пространственного разрешения, характеризующегося как диаметр оптического зонда. Исследована возможность использования предложенного метода для калибровки сканирующего ближнепольного оптического микроскопа непосредственно в процессе измерений параметров биологических объектов.

Ключевые слова: сканирующий ближнепольный оптический микроскоп, масштабный коэффициент, диаметр оптического зонда.

The methods of the scanning near-field optical microscope main metrological characteristics determination are proposed. These characteristics include a scale factor and a spatial resolution characterized as an optical probe diameter. The possibility of the proposed method usage for scanning near-field optical microscope calibration directly during the biological objects parameters measurement has been studied.

Key words: near-field scanning optical microscope, scale factor, optical probe diameter.

Возможность наблюдения и исследования объектов при большом увеличении представляется крайне важной для современных естественных и технических наук. Традиционно для этих целей применяли оптическую микроскопию, отличающуюся низкой инвазивностью, простотой эксплуатации и функциональной специфичностью. Однако разрешающая способность, достигаемая при помощи оптических методов, ограничивается приблизительно половиной длины волны используемого излучения. Для видимого света это приводит к теоретическому пределу разрешения в 200—300 нм. Данное ограничение мотивировало исследователей к разработке методов высокого разрешения, таких как ультрафиолетовая (УФ), электронная и атомно-силовая микроскопия (АСМ).

При исследовании биологических объектов (БО) УФ-микроскопия является высоко деструктивным методом, так как ряд биологически важных соединений (белки, нуклеиновые кислоты) под воздействием данного излучения меняют свою исходную структуру или разрушаются. Электронная микроскопия (просвечивающая и сканирующая) требует сложной подготовки БО препаратами, при которой свойства исходной живой клетки существенно искажаются. Метод АСМ можно с уверенностью назвать прочно укрепившимся в современной биологии, где он находит множество применений, чаще всего, для картирования механических свойств БО с латеральным разрешением вплоть до нескольких нанометров. Важным достоинством метода АСМ является то, что он позволяет проводить измерения на живых объектах (клетках). Однако эксперименты подобного плана достаточно сложны в реализации, а интерпретация данных АСМ при наличии сложной морфологии становится весьма затруднительной.

Оптическая микроскопия, несмотря на ограничения по разрешению, обладает принципиальными преимуществами по сравнению с перечисленными выше методами, поскольку позволяет получать важную информацию о параметрах БО, доступную только при их зондировании оптическим излучением. К такой информации относятся распределения коэффициента излучения и поглощения, показателя преломления, спектральные и поляризационные характеристики исследуемых объектов. Указанные параметры имеют большое значение для исследования структуры и свойств БО, в том числе для задач, связанных с детектированием одиночных мембранно-связанных молекулярных комплексов или отдельных молекул на поверхности клетки по характерным для них спектрам флуоресценции [1, 2].

Необходимость получения оптического контраста в видимом диапазоне в сочетании с разрешающей способностью, лежащей в нанометровом диапазоне (≤ 100 нм), привела к широкому применению в биологических исследованиях метода сканирующей ближнепольной оптической микроскопии (СБОМ).

В большинстве используемых на практике ближнепольных микроскопов объект освещается лазерным излучением через нанометровую апертуру (порядка 100 нм), которая при сканировании объекта поддерживается на фиксированном расстоянии нескольких десятков нанометров (в области ближнего поля) при помощи системы обратной связи (аналогичная система применяется в методе АСМ). Благодаря этому становится возможной параллельная регистрация топографии поверхности объекта и его оптических свойств. Разнообразные современные спектральные методы, такие как флуоресцентная и рамановская (комбинационного рассея-

ния) спектроскопия, получают дальнейшее развитие в результате их интеграции в СБОМ.

К одной из наиболее ярких и ранних работ по применению ближнепольного микроскопа в биологии можно отнести исследование распределения по мембране эритроцитов белков возбудителя малярии [3]. В настоящее время подобные задачи составляют основную часть практических применений СБОМ в биологии. Важно отметить, что приложения СБОМ не ограничиваются подобными задачами, а также часто используются для характеристики структуры важнейших биополимеров в системах *in vitro* [4].

Несмотря на быстрое развитие экспериментально-технической базы СБОМ, многие теоретические аспекты этого метода остаются мало изученными. Аналогичная ситуация и в области исследования метрологических характеристик различных видов приборов (ближнепольных микроскопов), реализующих метод СБОМ. В большинстве работ по исследованию БО отсутствуют данные об измерительных характеристиках конкретного прибора. Это усложняет интерпретацию полученных результатов и снижает их научную ценность, особенно в том случае, когда отсутствуют достоверные данные о геометрических параметрах объекта. Как правило, многие изучаемые БО имеют сложную морфологию и характеризуются неоднородными оптическими свойствами. Поэтому в ходе эксперимента исследователь многократно меняет увеличение микроскопа с целью достижения оптимального по увеличению и размеру поля зрения изображения. При этом для каждого получаемого изображения необходимо иметь информацию о предельном разрешении, которое может быть различным в зависимости от условий регистрации, параметров поверхности образца и др.

В связи с этим целью данной работы является разработка и исследование метода, который позволил бы определять увеличение (масштабный коэффициент) и разрешение

изображений, получаемых с применением СБОМ независимо от конкретной настройки микроскопа в процессе изучения БО.

Особенности СБОМ. В классической микроскопии формируется увеличенное изображение объекта как целого. В оптической микроскопии это осуществляется при помощи стеклянных линз, а в просвечивающей электронной микроскопии — электромагнитных аналогов линз. Параметры системы, создающей изображение, и характеристики используемого зондирующего излучения задают основные метрологические характеристики геометрии получаемых изображений, к которым относятся увеличение и разрешение.

Различные виды сканирующей зондовой микроскопии основаны на использовании зонда, создающего область локального взаимодействия определенного типа с исследуемым объектом. От вида взаимодействия зависит выбор микроскопии — атомно-силовая, туннельная, емкостная и т. д. Интенсивность взаимодействия пропорциональна сигналу отклика, который отображается как амплитуда точки (пиксела) изображения. После этого происходит пошаговое перемещение зонда, и регистрация амплитуды сигнала отклика для следующей точки изображения. Таким образом, формируется попиксельное формирование изображения. Полученное изображение подобно классическому оценивается метрологическими характеристиками его геометрических параметров; аналог увеличения — размеры пиксела, которые соответствуют шагу перемещения зонда. Размеры области взаимодействия зонда с объектом определяют разрешение. Однако поскольку в настоящее время классическое рэлеевское разрешение в нанодиапазоне можно определить лишь в редких случаях, то для характеристики разрешения можно воспользоваться величиной, называемой «эффективный диаметр зонда», как в сканирующей электронной микроскопии [5].

В методе СБОМ субмикронный размер области оптического взаимодействия с объектом достигается вследствие применения наноразмерных отверстий — диафрагм. Поэтому важнейшим элементом ближнепольного микроскопа является оптический зонд с субволновой апертурой, через которую освещается образец. Электромагнитное поле возле апертуры имеет сложную структуру. Непосредственно за отверстием располагается ближняя зона (поле) оптического излучения, что легло в основу названия метода в целом. В этой зоне электромагнитное поле образовано преимущественно затухающими волнами с быстро убывающими амплитудами при удалении от апертуры. На расстояниях больших $100d$ (d — диаметр апертуры) находится дальняя зона, характеризующаяся лишь излучательными модами.

При взаимодействии света с объектами, имеющими элементы структуры существенно меньше длины волны, информация об этой структуре содержится в затухающих или эванесцентных волнах, которые нельзя зарегистрировать в классических оптических схемах. Метод СБОМ позволяет преодолеть эту трудность, так как при расположении объекта непосредственно в ближней зоне затухающие волны преобразуются в распространяющиеся [6].

Расчеты структуры поля на выходе из субволновой апертуры зонда, сделанные на основе классической теории Бете—Боукампа [7], показывают, что поле на выходе из отверстия имеет значительно неоднородную структуру, сильно зависящую от направления поляризации. Если в качестве при-

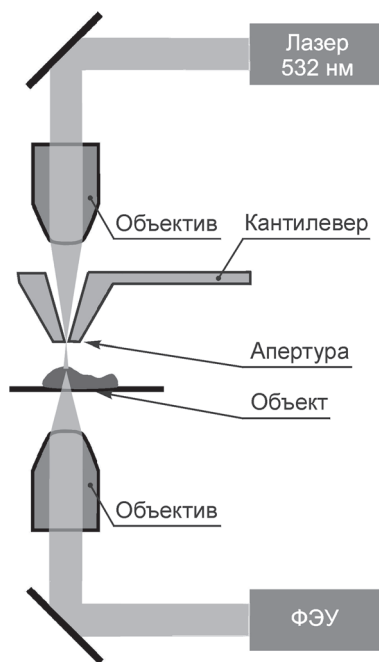


Рис. 1. Схема оптической конфигурации микроскопа WITec alpha300 при использовании режима СБОМ:

ФЭУ — фотоэлектронный умножитель

ближения существенно упростить структуру поля после апертуры, то можно получить оценку для разрешения СБОМ по критерию Рэлея как расстояние между двумя точками [7]:

$$\Delta R \approx 2a + h,$$

где a — радиус апертуры; h — расстояние от центра апертуры до исследуемой точки объекта.

При использовании зонда радиусом апертуры 50 нм и расстоянии до поверхности исследуемого объекта 30 нм разрешение составит 130 нм.

Экспериментальная установка и метод обработки данных. Для получения ближнепольных изображений БО авторы настоящей статьи использовали сканирующий ближнепольный оптический микроскоп alpha300 фирмы WITec (ФРГ). Схема оптической конфигурации прибора представлена на рис. 1. Лазер Nd:YAG с длиной волны 532 нм соединен с измерительным блоком прибора одномодовым световодом. Линейно-поляризованный лазерный луч при помощи микрообъектива увеличением $20\times$ фокусируется на входное отверстие оптического кантилевера пирамидальной формы. Выходное отверстие кантилевера имеет диаметр около 100 нм. Свет, выходящий из апертуры кантилевера, попадает на объект, пройдя через него, собирается микрообъективом увеличением $60\times$ ($NA = 0,8$) и с использованием оптической системы передается на приемное устройство — фотоэлектронный умножитель ФЭУ.

При изготовлении кантилеверов диаметр выходной наноразмерной апертуры имеет существенный разброс. Поэтому радиус наноразмерного отверстия пирамидального оптического кантилевера микроскопа WITec alpha300 определяли по его изображениям, полученным сканирующим электронным микроскопом Zeiss NVision40. Радиус равен 50 нм.

Сканирование образца происходило в результате перемещения столика при помощи пьезодвигателей. Конструкция WITec alpha300 обеспечивает в процессе сканирования поддержание постоянного расстояния до поверхности исследуемого объекта, которое составляет приблизительно 30 нм. В состав WITec alpha300 также входит флуоресцентный рамановский спектрометр.

В ходе экспериментов с применением микроскопа WITec alpha300 были получены различные изображения структуры клеток макрофагов, инкубированных с суспензиями образца полистирольных шариков (ПШ) различных размеров. Данные шарiki использовались как мера для определения масштабного коэффициента и оценки пространственного разрешения. Такие ПШ широко применяют в биологических исследованиях в качестве различного вида маркеров, в том числе и при помощи СБОМ [8].

Значительное преимущество метода СБОМ по сравнению с традиционной оптической или конфокальной микроскопией может быть наглядно проиллюстрировано на примере изображений, приведенных на рис. 2. Указанный прибор позволяет получать как традиционное микроскопическое изображение высокого разрешения (рис. 2, а), так и работать в режиме регистрации ближнего поля оптического излучения (рис. 2, б). На рис. 2, б видно, что полученное в режиме СБОМ изображение участка клетки (макрофага) с ПШ (диаметр 350 нм), находящимися внутри клетки, имеет существенно более высокое разрешение и позволяет их идентифицировать.

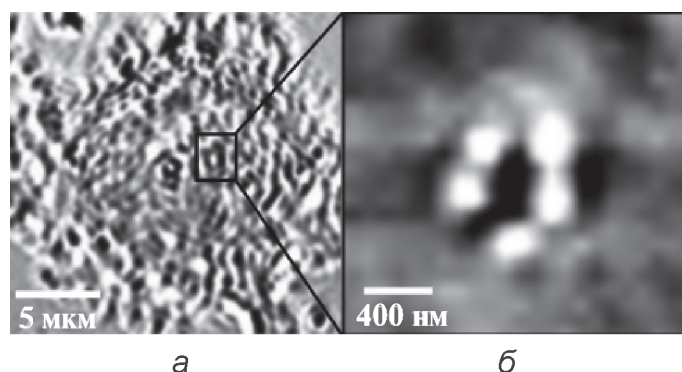


Рис. 2. Оптическое изображение:

а — макрофага, инкубированного с суспензией полистирольных шариков размером 350 нм, полученное при предельном разрешении; б — участка клетки с кластером из пяти полистирольных шариков, полученное методом СБОМ

Полистирольные шарiki — стандартные образцы Д40 (средний диаметр 350 нм) и фирмы Сигма (средний диаметр 1,5 мкм). Точные размеры ПШ определяли по изображениям, полученным при помощи сканирующего электронного микроскопа Zeiss NVision40 (рис. 3, а). Для этого ПШ осаживали на кремниевую подложку. На рис. 3, б приведены изображения тех же ПШ, полученные методом СБОМ.

В качестве БО использовали вторичную культуру перитонеальных макрофагов мыши (IC21). Клетки хранили в низкотемпературном морозильнике при температуре $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для проведения экспериментов клетки оттаивали, затем центрифугировали и ресуспендировали в ростовой среде (RPMI 1640), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллин и стрептомицин. Через неделю клетки снимали с поверхности флаконов, в которых наращивали культуры, с применением раствора трипсин-Версена и пересаживали на покровные стекла. Затем клетки инкубировали в течение 40 мин с суспензиями ПШ, после чего фиксировали при помощи 2 %-го глутарового альдегида. Подобная обработка клеток позволяет сохранить нативную форму и топографию поверхности клетки и не требует помещения клетки в раствор при проведении измерения. Покровные стекла с высаженными на них клетками затем использовали для получения СБОМ-изображений.

Обрабатывали изображения при помощи программного обеспечения WITec Project, SPIP 6.0.6. и Matlab. На первом этапе проводили нормализацию изображений в программе Matlab, позволяющей повысить контраст. Для расчета размеров ПШ на изображениях, полученных методом сканирующей электронной микроскопии, использовали встроенные в программу SPIP процедуры определения размеров частиц при аппроксимации их формы окружностью или эллипсом. Данная операция позволила определить средний диаметр частиц и разброс его значений. Отклонения формы ПШ от сферической на изображениях определяли методом Peak to Valley (PV) [9]. Контуры каждого шарика аппроксимировали окружностью методом наименьших квадратов. Затем вычисляли расстояние от каждой точки контура до центра построенной окружности (см. рис. 3, б). Искомое значение PV рассчитывали как разницу между максимальным R и минимальным r полученными значениями.

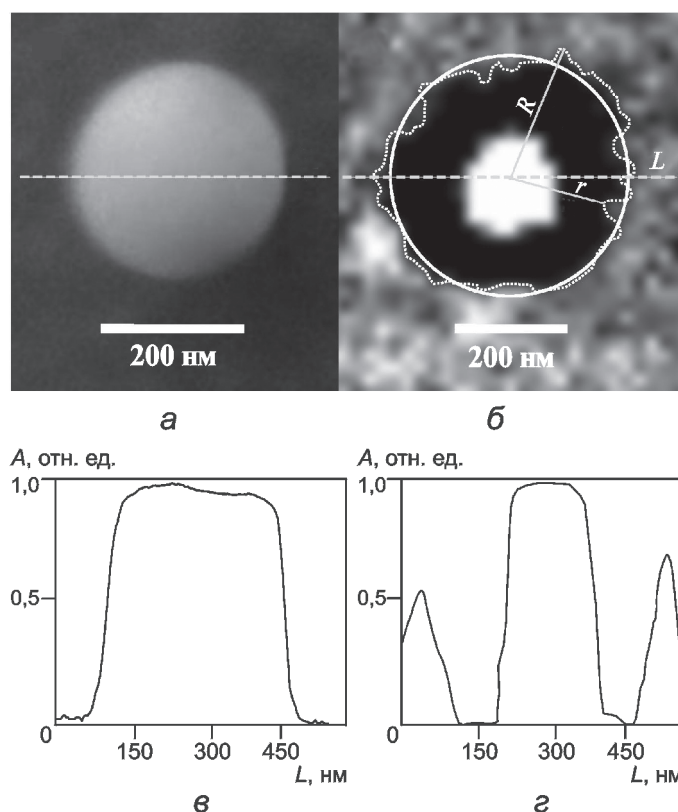


Рис. 3. Изображения полистирольных шариков размером 350 нм, полученные при помощи сканирующей электронной микроскопии (а), СБОМ (б) и соответственно их профили (в, г), построенные вдоль линии L ; пример расчета параметра PV по СБОМ-изображению полистирольных шариков (б)

Определение масштабного коэффициента СБОМ-изображения. Научная значимость исследований неотделима от метрологической достоверности результатов измерений, которая обеспечивается надежной предварительной калибровкой прибора. Калибровка микроскопа состоит в получении изображения эталонных объектов с известными геометрическими параметрами (объект-микрометр, калибровочные сетки). После этого при неизменной оптической конфигурации прибора (положение объектива, регистрирующей системы) проводятся измерения.

Конструкция классических микроскопов позволяет заметить эталонную меру, используемую при калибровке, на исследуемый объект без изменения оптической конфигурации прибора или воспроизвести конфигурацию с высокой точностью. В отношении СБОМ такая традиционная система калибровки оказывается трудноосуществимой.

Для СБОМ расстояние от объекта до оптического кантилевера задается параметрами обратной связи системы сканирования и может варьироваться в зависимости от участка образца. Также при смене образца, отличающегося от эталонной меры топографией и оптическими свойствами, нет гарантии, что параметры конфигурации системы, наблюдавшиеся при калибровке, будут воспроизведены. В связи с этим существует необходимость в калибровке масштабного коэффициента и его увеличения непосредственно в ходе эксперимента.

При исследовании БО (клеток) это можно осуществить путем внедрения в них ПШ известного диаметра. В этом случае метрологические характеристики прибора — масштабный коэффициент и разрешение — можно определить в ходе обработки полученного изображения.

Часто в связи с высокой степенью неоднородности исследуемых БО, важной является возможность локального определения разрешения и масштабного коэффициента. Если внедрить в клетку тест-образцы в достаточном количестве, то для каждого участка изображения можно определить значения указанных метрологических характеристик. В результате в пределах данной области, внутри которой свойства объекта изменяются незначительно, возможно достоверное измерение геометрических параметров исследуемого объекта с погрешностью, определяемой аппаратной погрешностью прибора.

Масштабный коэффициент задается параметрами сканирующей системы и определяется как размер пиксела или как шаг сканирующей системы (нанометр на пиксел). В ходе обработки изображений необходимо определить диаметр изображения ПШ в пикселах по его видеопрофилю, получаемому при помощи программы Matlab, и разделить размер ПШ (350 нм или 1,5 мкм) на число пикселей.

Вследствие рефракции оптического излучения на края шарика создается эффект фокусировки излучения. В центре изображения ПШ образуется яркое пятно, а вокруг краев — темный ореол (см. рис. 3, б). Моделирование процесса регистрации рефракционного изображения в ближней зоне показало, что диаметр ПШ следует находить по внешнему краю темного ореола (теневого изображения). Сопоставление результатов измерений диаметров шариков по видеопрофилям изображений, полученных методами сканирующей электронной микроскопии (см. рис. 3, в) и СБОМ (см. рис. 3, г), подтвердило правильность результатов моделирования.

Обработка изображений клеток с ПШ позволила определить масштабные коэффициенты при различных режимах сканирования, которые выбирали исходя из аппаратных возможностей прибора и удобства наблюдения. Большинство изображений имели коэффициенты 20 и 37 нм/пикс.

Суммарная погрешность измерения масштабного коэффициента обусловлена как неоднородностью диаметра массива ПШ, так и аппаратной погрешностью прибора и представляет среднюю квадратическую сумму этих погрешностей. Вычисленные погрешности составляют 9 и 7,8 % для коэффициентов 20 и 37 нм/пикс, соответственно. Полученные коэффициенты совпадают в пределах погрешности с заводскими значениями калибровки микроскопа WITec alpha300 на программно-аппаратном уровне.

Оценка инструментальной погрешности прибора. Рассмотрим модель оценки неопределенности измерений размеров ПШ, обусловленной инструментальной погрешностью прибора.

Создание эталонных объектов, в которых геометрическое распределение оптических свойств в наноразмерном диапазоне обеспечивало бы реализацию методов оценки разрешения по критерию Рэлея, представляет значительные технологические трудности. Кроме того, неоднородность поля непосредственно за апертурой и невозможность аналитического представления взаимодействия ближнего поля

с объектом, отличающимся сложной топографией, не позволяет использовать классический подход в вычислении пространственного разрешения. По этой причине корректнее оперировать термином «диаметр оптического зонда», аналогично тому, как это делается в сканирующей электронной микроскопии (диаметр электронного зонда) при калибровке с использованием различных мер [10]. В применении к СБОМ в рамках данной работы разрабатываемый подход заключался в воспроизведении аналога методики Раймера [11], основанной на размытии контура оптического объекта (ПШ) с достаточно контрастной границей. При таком подходе максимальная неопределенность измерения границ ПШ может быть сопоставлена с величиной, характеризующей диаметр оптического зонда. Последняя, в свою очередь, является аналогом аппаратного разрешения ближнепольного микроскопа.

В настоящей работе для количественной оценки размытия контура ПШ на изображении использовали параметр PV , характеризующий неоднородность контура изображения ПШ; его определение проиллюстрировано на рис. 3, б.

Соотношение между методом PV и критерием Рэлея может быть пояснено следующим образом. Необходимое условие различения двух ПШ, расстояние между границами которых равно d , является $d > PV$. Другими словами, если бы существовал тест-объект для СБОМ в виде двух близлежащих объектов, то не удалось бы различить объекты, находящиеся на расстоянии меньше PV . Для двух наборов изображений клеток, инкубированных с ПШ различных диаметров, было определено значение $PV = 160$ нм. Полученное значение сопоставимо с теоретической оценкой разрешения в 130 нм.

Выводы. Использование ПШ, внедренных в БО в качестве калибровочного тест-объекта, в ходе исследований методом СБОМ, позволило реализовать новые подходы к определению метрологических характеристик ближнепольного микроскопа. Применение предложенного авторами метода дало возможность без предварительной калибровки определить масштабные коэффициенты СБОМ-изображений БО, полученных при наиболее предпочтительных для исследователя увеличениях. Фактические значения масштабного коэффициента изображений составили $20 \text{ нм/пикс} \pm 9 \%$ и $37 \text{ нм/пикс} \pm 7,8 \%$.

Указанный подход, заключающийся в определении диаметра оптического зонда сканирующего ближнепольного оптического микроскопа для характеристики его аппаратной погрешности, а также нахождение диаметра оптического зонда методом PV , позволили оценить фактическое разрешение СБОМ.

В ходе эксперимента при получении изображений БО при помощи микроскопа WITec alpha300 с апертурой кантилеве-

ра 100 нм было достигнуто разрешение 160 нм. Данное значение сопоставимо с теоретическими оценками пространственного разрешения СБОМ — 130 нм. Это подтверждает правильность теоретической модели, используемой для расчета пространственного разрешения.

Предложенные методы определения основных метрологических характеристик СБОМ были успешно применены при исследовании перитонеальных макрофагов, что позволило существенно повысить достоверность измеренных геометрических параметров. Авторы полагают, что описанные подходы также могут быть полезны при исследованиях различных типов БО, например, фагоцитирующих клеток (в том числе макрофагов и нейтрофилов), нейронов, фибробластов и других клеточных культур.

Л и т е р а т у р а

1. **Koopman M. e. a.** Near-field scanning optical microscopy in liquid for high resolution single molecule detection on dendritic cells // *FEBS Lett.* 2004. N 573. P. 6—10.
2. **Hwang J. e. a.** Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy // *J. Biophys.* 1998. N 74. P. 2184—2190.
3. **Enderle Th. e. a.** Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy // *PNAS.* 1997. N 94. C. 520—525.
4. **Dunn R.** Near-field Scanning Optical Microscopy // *Chem. Rev.* 1999. N 99. P. 2891—2897.
5. **Reimer L.** Scanning Electron Microscopy. Berlin: Springer-Verlag, 1985.
6. **Vigoureux J., Depasse F., Girard C.** Superresolution of near-field optical microscopy defined from properties of confined electromagnetic waves // *App. Opt.* 1992. N 31. P. 3036—3045.
7. **Bethe H.** Theory of Diffraction by Small Holes // *Phys. Rev.* 1944. N 66. P. 163—182.
8. **Жданов Г. С., Либенсон М. Н., Марциновский Г. А.** Ближнепольная оптика. СПб.: ГУ ИТМО, 2007.
9. **Sy-Hann Chen e. a.** Convenient near-field optical measurement and analysis of polystyrene spheres // *Vacuum.* 2006. N 81. P. 129—132.
10. **Industrial Metrology: Surfaces and Roundness.** London: Springer-Verlag, 2002.
11. **Булыгин Ф. В., Лясковский В. Л.** Исследование методов измерения диаметра электронного зонда сканирующих электронных микроскопов с помощью современных мер нанометрового диапазона // *Метрология.* 2010. № 7. С. 34—43.

Дата принятия 16.07.2013 г.