

光电工程

Opto-Electronic Engineering

中文核心期刊 中国科技核心期刊
Scopus CSCD

光纤集成化高分辨率无标记差分显微成像系统

罗昊, 侯梦蝶, 徐良, 杨臻垚, 匡翠方, 曾祥龙, 朱大钊

引用本文:

罗昊, 侯梦蝶, 徐良, 等. 光纤集成化高分辨率无标记差分显微成像系统[J]. *光电工程*, 2023, **50**(12): 230181.

Luo H, Hou M D, Xu L, et al. Optical fiber integrated unlabeled differential super-resolution microscopic imaging system[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, **50**(12): 230181.

<https://doi.org/10.12086/oe.2023.230181>

收稿日期: 2023-07-20; 修改日期: 2023-11-11; 录用日期: 2023-11-13

相关论文

光片荧光显微镜研究进展

张子建, 徐欣, 王吉祥, 叶虹, 张欣, 史国华

光电工程 2023, **50**(5): 220045 doi: [10.12086/oe.2023.220045](https://doi.org/10.12086/oe.2023.220045)

基于光频双曲超材料的无标记远场超分辨显微成像

陈雪松, 杜文娟, 楼志浪, 汤东亮

光电工程 2022, **49**(11): 220056 doi: [10.12086/oe.2022.220056](https://doi.org/10.12086/oe.2022.220056)

Improved spatiotemporal resolution of anti-scattering super-resolution label-free microscopy via synthetic wave 3D metalens imaging

Yuting Xiao, Lianwei Chen, Mingbo Pu, Mingfeng Xu, Qi Zhang, Yinghui Guo, Tianqu Chen, Xiangang Luo

Opto-Electronic Science 2023, **2**(11): 230037 doi: [10.29026/oes.2023.230037](https://doi.org/10.29026/oes.2023.230037)

Single-shot mid-infrared incoherent holography using Lucy-Richardson-Rosen algorithm

Vijayakumar Anand, Molong Han, Jovan Maksimovic, Soon Hock Ng, Tomas Katkus, Annaleise Klein, Keith Bambery, Mark J. Tobin, Jitraporn Vongsvivut, Saulius Juodkazis

Opto-Electronic Science 2022, **1**(3): 210006 doi: [10.29026/oes.2022.210006](https://doi.org/10.29026/oes.2022.210006)

更多相关论文见光电期刊集群网站 

 **光电工程**
Opto-Electronic Engineering

<http://cn.ojournal.org/oe>



 OE_Journal

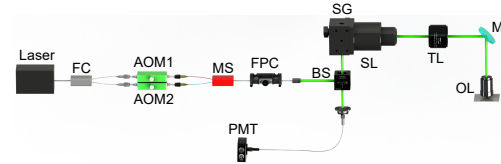


Website



DOI: 10.12086/oe.2023.230181

光纤集成化高分辨率无标记 差分显微成像系统



罗昊¹, 侯梦蝶³, 徐良^{1,2}, 杨臻垚¹,
匡翠方^{1,2*}, 曾祥龙^{3*}, 朱大钊^{1*}

¹之江实验室智能芯片与器件研究中心, 浙江 杭州 310023;

²极端光学技术与仪器全国重点实验室, 浙江 杭州 310027;

³上海大学特种光纤与光接入网重点实验室, 上海 200444

摘要: 得益于荧光标记技术, 远场超分辨显微成像技术的不断发展为人们打开了一道微观世界的大门。远场超分辨光学显微镜也成为现代医学、生命科学等领域研究发展的重要工具和设备。但是相比之下, 远场无标记显微成像技术发展却相对缓慢。为此, 本文提出了一种采用光纤器件的集成化差分显微成像方法。该方法通过特制的光纤模式选择耦合器(MSC)实现了差分成像系统中空心光斑的生成, 并解决了空心光斑和实心光斑严格对准困难的问题。搭建了一套结构简单紧凑, 高度集成化的无标记显微成像系统。实验中, 采用直径为 150 nm 的金颗粒和最小间距约 50 nm 的无标记聚合物线对结构对系统进行成像测试, 分辨率相较传统扫描共聚焦显微镜大幅提升。

关键词: 无标记显微成像; 光纤模式耦合; 差分扫描成像; 涡旋光调制

中图分类号: O439

文献标志码: A

罗昊, 侯梦蝶, 徐良, 等. 光纤集成化高分辨率无标记差分显微成像系统[J]. 光电工程, 2023, 50(12): 230181

Luo H, Hou M D, Xu L, et al. Optical fiber integrated unlabeled differential super-resolution microscopic imaging system[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, 50(12): 230181

Optical fiber integrated unlabeled differential super-resolution microscopic imaging system

Luo Hao¹, Hou Mengdie³, Xu Liang^{1,2}, Yang Zhenyao¹, Kuang Cuifang^{1,2*}, Zeng Xianglong^{3*},
Zhu Dazhao^{1*}

¹Research Center for Intelligent Chips and Devices, Zhejiang Lab, Hangzhou, Zhejiang 311121, China;

²State Key Laboratory of Extreme Photonics and Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China;

³Key Laboratory of Specialty Fiber Optics and Optical Access Networks, Shanghai University, Shanghai 200444, China

Abstract: Far-field super-resolution microscopic imaging technology based on fluorescent labels opened a gate to the microscopic world, which has become an important tool in the research of modern medicine and life science. However, the development of far-field unlabeled super-resolution microscopy is relatively slow. Here, an integrated differential microscopic imaging method using optical fiber devices is proposed in this article. The generation of

收稿日期: 2023-07-20; 修回日期: 2023-11-11; 录用日期: 2023-11-13

基金项目: 浙江省自然科学基金探索青年项目(LQ22F050017); 国家自然科学基金青年科学基金项目(62105298); 中国博士后科学基金面上项目(2021M692954); 之江实验室重大项目(2020MC0AE01)

*通信作者: 匡翠方, cfkuang@zju.edu.cn; 曾祥龙, zenglong@shu.edu.cn; 朱大钊, zhudz@zhejianglab.com。

版权所有©2023 中国科学院光电技术研究所

hollow spots in the differential imaging system is realized by a special fiber mode selection coupler (MSC). The problem of strict alignment between hollow and solid spots is naturally solved in this method. A highly integrated label-free microscopic imaging system was established. In experiments, gold particles with a diameter of 150 nm and unlabeled polymer lines with a minimum spacing of about 50 nm were imaged to test the imaging system. The resolution of the imaging system shows great improvement compared to conventional scanning confocal microscopy.

Keywords: label-free microscopic imaging; fiber mode coupling; differential scanning imaging; vortex beam modulation

1 引言

由于光的衍射效应, 在过去的很长一段时间里, 科学界一致认为传统光学显微成像系统的最小分辨能力存在极限, 显微系统能分辨出的最小细节信息大约在照明光波长的一半量级。直到上世纪 90 年代, 许多科学家提出了多种新型的显微成像方案来突破衍射极限。包括已被广泛应用的受激辐射损耗显微镜 (stimulated emission depletion microscopy, STED)^[1-4]、随机光学重建显微术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[5-6]、光激活定位显微术 (photo-activated localization microscopy, PALM)^[6-8]、结构光照明显微术 (structured illumination microscopy, SIM)^[9-10]、荧光发射差分显微术 (fluorescence emission difference microscopy, FED)^[11]、光片荧光显微术 (light sheet fluorescence microscopy, LSFM)^[12] 等。但这些方法大多基于荧光发射机制, 也就是需要样品自身在激发光照射下发出另一波长的携带样品信息的光信号。在生命科学领域和医学研究领域, 研究对象往往是细胞、组织等, 可以通过荧光蛋白标记被测样品来使样品具备荧光特性, 以满足上述超分辨成像方法的需求。但对于非生命样品、无法进行荧光蛋白标记的样品而言, 上述方法便很难发挥作用。然而近年来对于无标记样品的超分辨显微成像技术的发展相对缓慢。

目前在观测无法标记的样品时, 较为成熟的方法是近场扫描光学显微 (scanning near-field optical microscopy, SNOM) 技术。此外, 基于纳米结构的光调制方案也可以实现无标记样品的超分辨成像, 包括超透镜成像^[13]、微球成像^[14]、基于超材料的显微成像^[15] 等, 这些技术在某些应用场景可以提供媲美荧光标记超分辨技术的高分辨率。但遗憾的是, 这些技术大部分只能作用于样品表面, 成像深度有限。再者, 这些方法往往对器件的制造精度具有很高要求, 技术手段

相对复杂, 综合实现成本较高。为此, 发展新的无标记高分辨成像技术仍然是目前科学界的重要任务。

荧光发射差分 (FED) 显微技术最早应用于荧光样品, 采用相同波长的实心光斑和空心光斑分别对样品进行成像, 后经数据处理将所得的两幅图像整合成一张具有超分辨细节信息的图像。由于 FED 技术无需对特定的荧光标记进行激发和抑制, 实际上可以推广应用于无标记的超分辨成像系统。在传统方法中, 空心光斑和实心光斑的生成与调控是基于空间光调制器或涡旋相位板以及多组空间光学器件实现的, 导致系统光路复杂, 调节难度大, 且运行过程中易受外部干扰而影响最终成像质量。

近年来, 多种通过光纤器件生成环形光束的方案被相继提出。得益于光纤中的高阶模式均具有圆对称性, 尤其是近年来被广泛研究的光纤 LP_{11} 标量模式, 其在单独 x 方向或 y 方向的模场分布形式为被一条暗线分为两半的圆, 若两种分量的比例相同, 则合光场分布正好为一个圆环形式。光纤标量模中的 LP_{11} 模式又对应四种矢量模式: TE_{01} , TM_{01} , 以及 HE_{21} 的两种简并模式, 这些矢量模式均具有单环形的光场强度分布形式, 且具有中心对称的偏振态分布形式, 也被称作柱矢量光 (cylindrical vector beam, CVB)^[16-21]。并且上述四种矢量模式中相互正交的两种模式组合后即可得到具有螺旋状相位波前的涡旋光 (optical vortex beam, OVB)。例如 Zou 等人提出的全光纤激光器^[22], 通过将少模光纤和 Pr^{3+}/Yb^{3+} 掺杂的 ZrF_4 - BaF_2 - LaF_3 - AlF_3 - NaF (ZBLAN) 光纤的纤芯错位对接, 从而激发出特定的光纤模式, 可直接输出波长为 635 nm 的涡旋光。Zhang 等提出了一种采用声致光纤光栅的方案在少模光纤中产生 532 nm 波长的高阶模式的方案^[23]。Yan 等设计了特殊的多层结构光纤, 通过在这种光纤上写入长周期光纤光栅 (long period fiber grating, LPFG), 可以将输入其中的基模光场转化为环形光输

出^[24]。

本文提出了一种基于光纤模式选择耦合器 (mode select coupler, MSC) 的差分成像方法 (MSC-FED)。首先基于光纤模式耦合机制设计制备了一种光纤模式选择耦合器 (MSC), 优于上述其它形式的模式选择方案, 该 MSC 实现了 94% 的模式转化效率和 98% 的输出模式纯度。该耦合器有两个输入端口, 通过其中一端输入普通高斯光将转化为环形光场分布的涡旋光输出, 通过另一端输入普通高斯光将保持以高斯型光场分布的光纤基模形式输出。并且由于上述两种输出光束均通过光纤器件的同一端口出射, 直接实现了两种光束在后续光路中始终保持精确的中心重合。利用该器件解决了光斑形态、严格对准的调控问题, 并实现了基于 FED 原理的无标记显微成像。本方法充分发挥 FED 成像直接应用于高分辨率无标记图像的技术优势, 更极大地增加了系统的集成度, 降低了系统成本。

2 基本原理

2.1 光纤 MSC 器件的基本原理

通过光纤 MSC 器件选择性输出实心光斑和空心光斑, 充分利用了光纤中的前两阶标量模式: 光纤中的基模 LP_{01} 模式的光场横截面为高斯型分布, 在大

NA 透镜聚焦下可得优质的圆形光斑; 光纤中的 LP_{11} 模式在两正交偏振分量比例相等的情况下, 其光场横截面为单环形分布, 当满足一定条件时, 该光场可转化为具有螺旋状相位波前的涡旋光 (OVB), 在大 NA 透镜聚焦下可得具有明显暗心的环形光斑。

根据光纤模式耦合理论, 当两根光纤的纤芯足够接近时, 如果两光纤中存在等效折射率相近的两种传输模式, 则在其中一根光纤中以特定模式传输的光功率会向另一根光纤中的对应模式耦合, 并且这种功率耦合是可逆的, 会在耦合区域内沿传播方向周期性地发生。结合本系统的实际需求, 选取一根对于 532 nm 波长的少模光纤 (FMF) 与一根对于 532 nm 波长的单模光纤 (SMF) 并行熔融拉锥制成光纤 MSC。如图 1(a) 所示, 通过精确控制耦合区的相关参数, 使得输入到单模光纤的 532 nm 连续激光极大程度地耦合到少模光纤的 LP_{11} 模式中并通过少模光纤输出。以光纤基模形式输入到少模光纤的 532 nm 连续激光, 由于不满足模式耦合条件, 最终仍以基模形式通过该少模光纤输出, 如图 1(b) 所示。在耦合区内, 两根光纤的包层熔融在一起, 纤芯形成双锥型结构。为了避免外界扰动对模式耦合效率的影响, MSC 的熔融拉锥区域被封装在 U 型玻璃基底上, 然后通过热缩管密封。

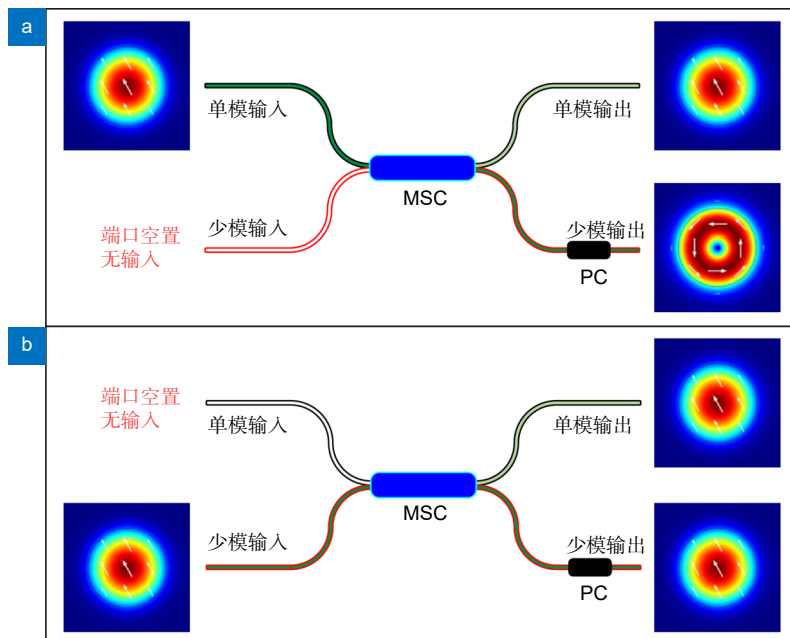


图 1 光纤模式选择耦合器原理图。当基模形式激光分别从 (a) 单模光纤, 以及 (b) 少模光纤输入端输入 MSC 时, 单模光纤输出端与少模光纤输出端分别输出的光场分布形式

Fig. 1 Schematic diagram of the fiber mode selection coupler. Output of the single-mode fiber and the few-mode fiber, when the fundamental mode laser is separately launched into (a) the single-mode fiber, and (b) the few-mode fiber

制备 MSC 的两种光纤在未拉锥前的主要参数如下: 单模光纤的纤芯直径为 6.2 μm, 包层直径为 125 μm, 纤芯折射率为 1.4678, 包层折射率为 1.4615; 少模光纤的纤芯直径为 14 μm, 包层直径为 125 μm, 纤芯折射率为 1.467, 包层折射率为 1.4615。

为使通过单模光纤输入的 LP₀₁ 模式的 532 nm 连续激光最大程度地耦合到少模光纤的 LP₁₁ 模式中, 需保证 MSC 耦合区域内两种相应模式的等效折射率相同。由于拉锥过程不改变纤芯和包层的折射率, 只是等比例缩小纤芯和包层直径, 又因为实际采用的单模和少模光纤的包层直径相对纤芯直径来说足够大, 所以影响拉锥后光纤内本征模式等效折射率的主要参数只有拉锥后的纤芯直径。图 2 给出了拉锥后单模光纤中 LP₀₁ 模式 (图中黑色曲线), 以及少模光纤中 LP₁₁ 模式 (图中红色曲线) 的等效折射率对应拉锥后纤芯直径大小的关系。

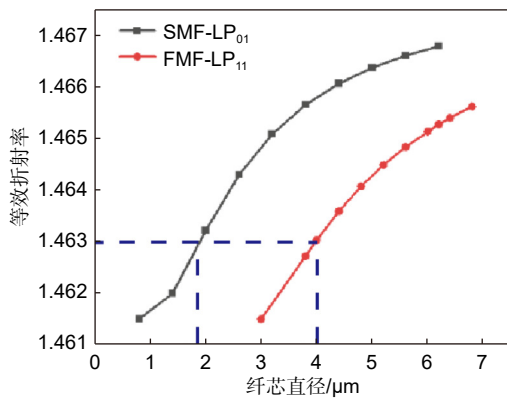


图 2 对于 532 nm 工作波长, 单模光纤中 LP₀₁ 模式和少模光纤中 LP₁₁ 模式的等效折射率与纤芯直径的对应关系
Fig. 2 Mode effective index curves for the LP₀₁ mode in SMF and the LP₁₁ mode in FMF as functions of core radius, at the wavelength of 532 nm

另一方面, 当少模光纤的纤芯直径为 4 μm 时, 该光纤恰好仅支持前两阶标量模式 (LP₀₁ 模式和 LP₁₁ 模式) 的传输。所以在实际制备 MSC 的过程中, 将耦合区域内少模光纤的直径控制在 4 μm 左右, 可有效避免输入光功率耦合至三阶以上标量模式中导致输出的环形光质量下降。

通过图 2 可知, 当少模光纤的纤芯直径为 4 μm 时, 其中支持的 LP₁₁ 模式的等效折射率约为 1.463, 在图中找到单模光纤中 LP₀₁ 模式同样具有等效折射率 1.463 的点, 对应的纤芯直径约为 1.8 μm。所以实际制备 MSC 时将耦合区域内少模光纤的纤芯直径控制在 4 μm, 并将耦合区域内单模光纤的纤芯直径控

制在 1.8 μm。

制备 MSC 时首先将少模光纤和单模光纤进行预拉锥, 令单模光纤与少模光纤的纤芯直径比例为 0.45。然后将预拉锥后的单模光纤与少模光纤并排放置, 并再次进行熔融拉锥。由于熔融拉锥的过程中, 两光纤纤芯的直径会等比例缩小, 当少模光纤的纤芯直径缩小为 4 μm 时, 单模光纤的纤芯直径会自然缩小为 1.8 μm。

根据光纤耦合模式理论, 在耦合区域内, 单模光纤与少模光纤中场强的变化规律如下:

$$\frac{dA_1(z)}{dz} = i(\beta_1 + C_{11})A_1 + iC_{12}A_2, \quad (1)$$

$$\frac{dA_2(z)}{dz} = i(\beta_2 + C_{22})A_2 + iC_{21}A_1, \quad (2)$$

其中: $A_1(z)$ 、 $A_2(z)$ 分别为单模光纤中光纤基模的强度与少模光纤中 LP₁₁ 模式的振幅, 二者是耦合区域传输距离 z 的函数, β_1 和 β_2 分别为上述两种模式的等效传输常数, C_{11} 和 C_{12} 是自耦合系数, C_{12} 和 C_{21} 是互耦合系数。通常自耦合系数相对互耦合系数很小, 可忽略, 且两互耦合系数近似相等, 即 $C_{12} = C_{21} = C$ 。互耦合系数是与耦合区域尺寸和长度相关的参数。

由式 (1)~(2) 可得激光从单模光纤输入端输入 MSC 时, 两输出端口的光功率与耦合区长度的关系:

$$P_1(z) = |A_1(z)|^2 = 1 - F^2 \sin^2\left(\frac{C}{F}z\right), \quad (3)$$

$$P_2(z) = F^2 \sin^2\left(\frac{C}{F}z\right), \quad (4)$$

$$\text{式中 } F = \left[1 + \frac{(\beta_1 - \beta_2)^2}{4C^2}\right]^{-\frac{1}{2}}.$$

带入本文中应用 MSC 的实际参数, 可得激光以基模形式输入单模光纤输入端时, 光场在 MSC 的耦合区域中周期性转化的规律, 如图 3 所示 (Rsoft 软件仿真结果)。由图可知, 在耦合区内, 单模光纤中的基模功率与少模光纤中 LP₁₁ 模式的功率以大约 800 μm 的传输距离为半周期相互耦合转化。当耦合区长度满足匹配条件时, 两模式间的互耦合系数最高可达 98%。

理论上, 当 MSC 耦合区的长度刚好为奇数个完整耦合周期的一半时, 输入 SMF 的激光功率将被最大程度地耦合到 FMF 的 LP₁₁ 模式中。仿真结果表明, 当耦合区域的长度和纤芯直径满足匹配条件时, 以 LP₀₁ 模式输入 SMF 的工作波长 532 nm 的光功率几乎可以完全耦合到 FMF 的 LP₁₁ 模式中, 如图 4 所示。

另一方面, 由于少模光纤中的基模光场并不满足

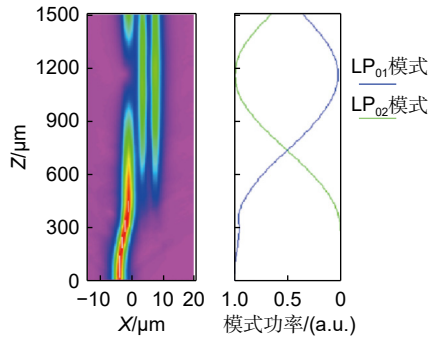


图 3 在 MSC 的耦合区域中, 单模光纤中的 LP₀₁ 模式和少模光纤中的 LP₁₁ 模式周期性转化规律的仿真图

Fig. 3 Simulation of periodic transformation between the LP₀₁ mode in the single-mode fiber and the LP₁₁ mode in the few-mode fiber, in the coupling region of MSC

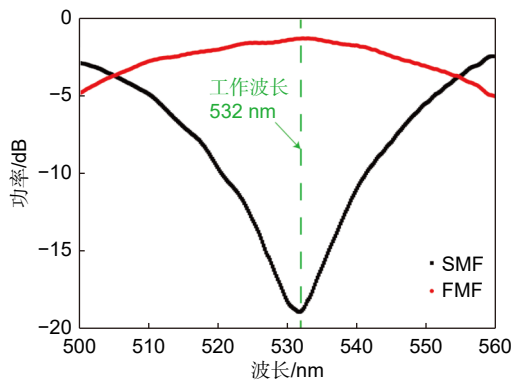


图 4 在满足匹配条件的情况下, 宽谱激光从 MSC 的单模光纤输入端注入时, 从单模光纤输出端 (黑色曲线) 和少模光纤输出端 (红色曲线) 输出的光谱图。在工作波长 532 nm 下, 绝大部分功率从少模光纤端输出

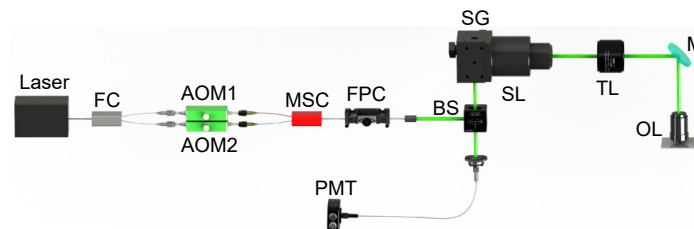
Fig. 4 Spectrum diagram of the output of the single-mode fiber (black curve) and the output of the low-mode fiber (red curve) when the wide-spectrum laser is injected from the single-mode fiber input of the MSC under the matching conditions. At the working wavelength of 532 nm, most of the power output is from the few-mode fiber end

与单模光纤中任意模式的耦合匹配条件, 所以以 LP₀₁ 模式输入 FMF 的光功率可保持 80% 以上的效率

仍以 LP₀₁ 模式在 FMF 中传输。制备过程中, 在拉锥的同时保持将 532 nm 波长的连续光输入 SMF, 并实时监测 FMF 输出的光场分布形式和功率。经过多次实验将拉锥的温度、速度、时间等参数迭代优化, 最终得到模式耦合效率最高的 MSC。实测本实验中采用的 MSC, 当激光从单模光纤注入, 并以 LP₁₁ 模式从少模光纤输出时, 传输损耗约为 1 dB, 端口间串扰约为 0.008 dB。

2.2 MSC-FED 成像系统原理

采用光纤器件替代传统空间光传输和调控, 极大地增加了系统的集成度。系统的基本原理如图 5 所示。由半导体激光器发出的波长为 532 nm 的连续激光首先经过一个 1×2 耦合器被分为两路, 然后分别经过一个集成在光纤光路中的声光调制器 (AOM), 以实现上升沿/下降沿时间均小于 10 ns 的高速开关控制。经过 AOM 后的两路光分别入射上文所述光纤 MSC 的单模光纤输入端和少模光纤输入端。通过对 AOM 的开关控制, 两路光分时从光纤 MSC 的少模光纤输出端交替输出。在光纤 MSC 的少模光纤输出端还加入了光纤偏振态控制器 (FPC) 对输出光场做进一步调制, 使通过 MSC 单模光纤输入端输入的激光激发出的 LP₁₁ 模式中原本比例随机的四种矢量模重新分配, 最终获得涡旋光形式的光场输出。在系统初始调节时, 首先在光纤 MSC 的输出端准直镜后放置一台 CCD 相机, 将 MSC 少模光纤输入端的光纤 AOM 开关关闭, 并将单模光纤输入端的光纤 AOM 开关打开。此时 MSC 输出光场为 LP₁₁ 模式, 该模式由两种偏振方向正交的兼并模式组成, 本系统要求两种正交偏振的模式分量比例相等, 从而使合光场为完美的环形分布。通过调节置于光纤 MSC 输出端附近的 FPC 对光纤尾端做微小的旋转和挤压, 可以连续地调节输出光场中



Laser: Continuous laser at 532 nm wavelength; FC: 1×2 fiber coupler; AOM: Acousto-optic modulator integrated in the fiber optic path; MSC: Fiber mode selection coupler; FPC: Fiber polarization state controller; BS: Beam splitter; SG: scanning galvanometer; SL: Scanning lens; TL: Tube lens; M: Mirror; OL: Objective lens; PMT: Photo-multiplier tube

图 5 基于光纤 MSC 的 FED 成像系统原理图

Fig. 5 Schematic diagram of the FED imaging system based on the fiber MSC

两种正交偏正分量的占比。通过 CCD 相机观测可见光场从“分为上下两个半圆”到“一个完整的圆环”到“分为左右两个半圆”的连续变化过程。当调节 FPC 并观察到一个接近完美的圆环形光场分布时，锁定 FPC，并将整个光纤光路用挡板遮罩避免外界干扰。实验结果表明，通过上述方法调节后，在系统连续运行中，光纤 MSC 输出的环形光场分布可保持 6 小时以上稳定不变。

从光纤 MSC 输出的光场可视为一个通过小孔的点光源，发散的光场经透镜准直后首先经过一个半反透镜，反射光再经过一组二维扫描振镜反射，之后依次经过扫描镜、场镜和显微物镜后聚焦在样品面上。当扫描光斑扫描到样品时，部分被样品散射的光信号反向经过物镜、场镜、扫描镜、二维扫描振镜后经过半反透镜，透射光最终被一根多模光纤收集并传输到 PMT 进行信号处理。

FED 系统成像时需进行两次扫描：第一次关闭连接 MSC 单模光纤输入端的 AOM2，打开连接 MSC 少模光纤输入端的 AOM1，此时 MSC 输出为光纤基模形式光场，在样品面上的聚焦光斑为圆形的实心光斑。通过二维扫描振镜的运动，使实心光斑扫描一个区域并得到一幅图像 I_c ；第二次关闭连接 MSC 少模光纤输入端的 AOM1，打开连接 MSC 单模光纤输入端的 AOM2，此时 MSC 输出为涡旋光形式光场，在样品面上的聚焦光斑为环形的空心光斑。通过二维扫描振镜的运动，使空心光斑扫描同一个区域并得到一幅

图像 I_n 。通过两次扫描图片加权相减，即可得到更多的样品细节信息，可通过式 (5) 描述：

$$I_{FED} = I_c - r \cdot I_n, \quad (5)$$

式中： I_{FED} 为数据整合后的图像， r 为加权系数，该值通过实际扫描时实心光斑和空心光斑的具体参数确定。

首先通过 MSC 中少模光纤输出端的实际光纤参数：纤芯直径为 $14 \mu\text{m}$ ，包层直径为 $125 \mu\text{m}$ ，纤芯折射率为 1.467，包层折射率为 1.4615。通过仿真软件解得其中 LP_{01} 模式和 LP_{11} 模式的模场分布，如图 6 所示 (Comsol 软件仿真结果)。

由于从 MSC 输出的两种模式光场经由后续透镜组进行等比例缩放，所以在选择式 (5) 中的加权值 r 时，可直接通过少模光纤输出端口处两种模式光场分布来近似实际扫描光斑的光场分布进行分析。

为了更直观地展示式 (5) 中加权系数 r 对由实心光斑和空心光斑合成的等效扫描光斑的影响，我们将功率归一化后的实心光斑、空心光斑以及二者加权相减后所得的等效扫描光斑制成三维光场分布图。如图 7 所示，实心光斑减去 0.5 倍、0.7 倍和 1 倍的空心光斑后，分别得到相应的等效扫描光斑。这三种光斑沿直径的光场分布曲线分别如图 7(a-c) 所示，其中紫色虚线代表实心光斑的光场分布、蓝色虚线代表加权后的空心光斑的光场分布、红色实线代表二者相减所得等效光斑的光场分布。

在少模光纤输出端口处，归一化 LP_{01} 模场的半

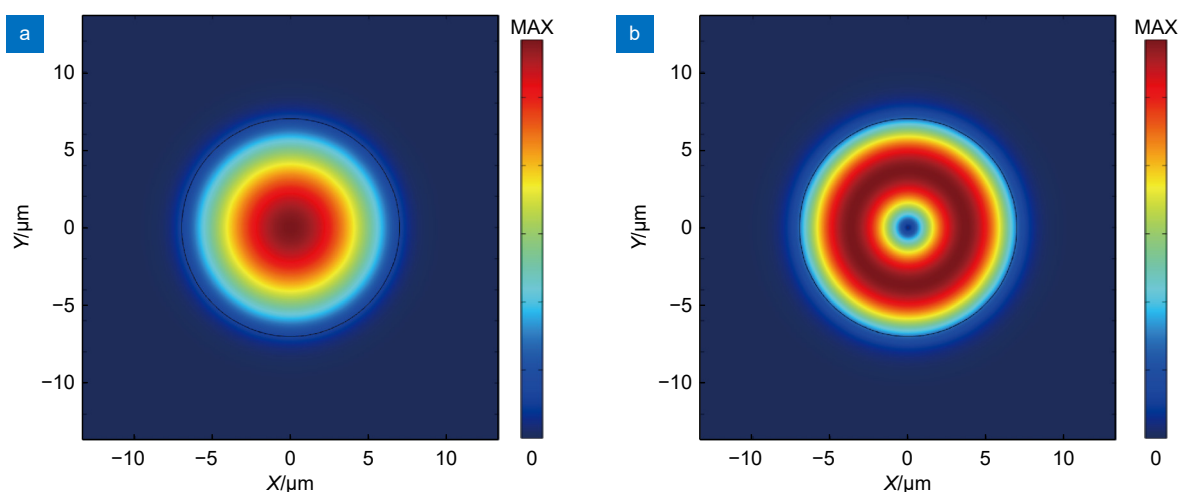


图 6 光纤 MSC 中少模光纤输出端支持的前两阶本征标量模式的光场分布图。

(a) LP_{01} 模式; (b) LP_{11} 模式

Fig. 6 Optical field distribution of the first two order eigenmodes supported by the LFM output end of MSC.

(a) LP_{01} mode; (b) LP_{11} mode

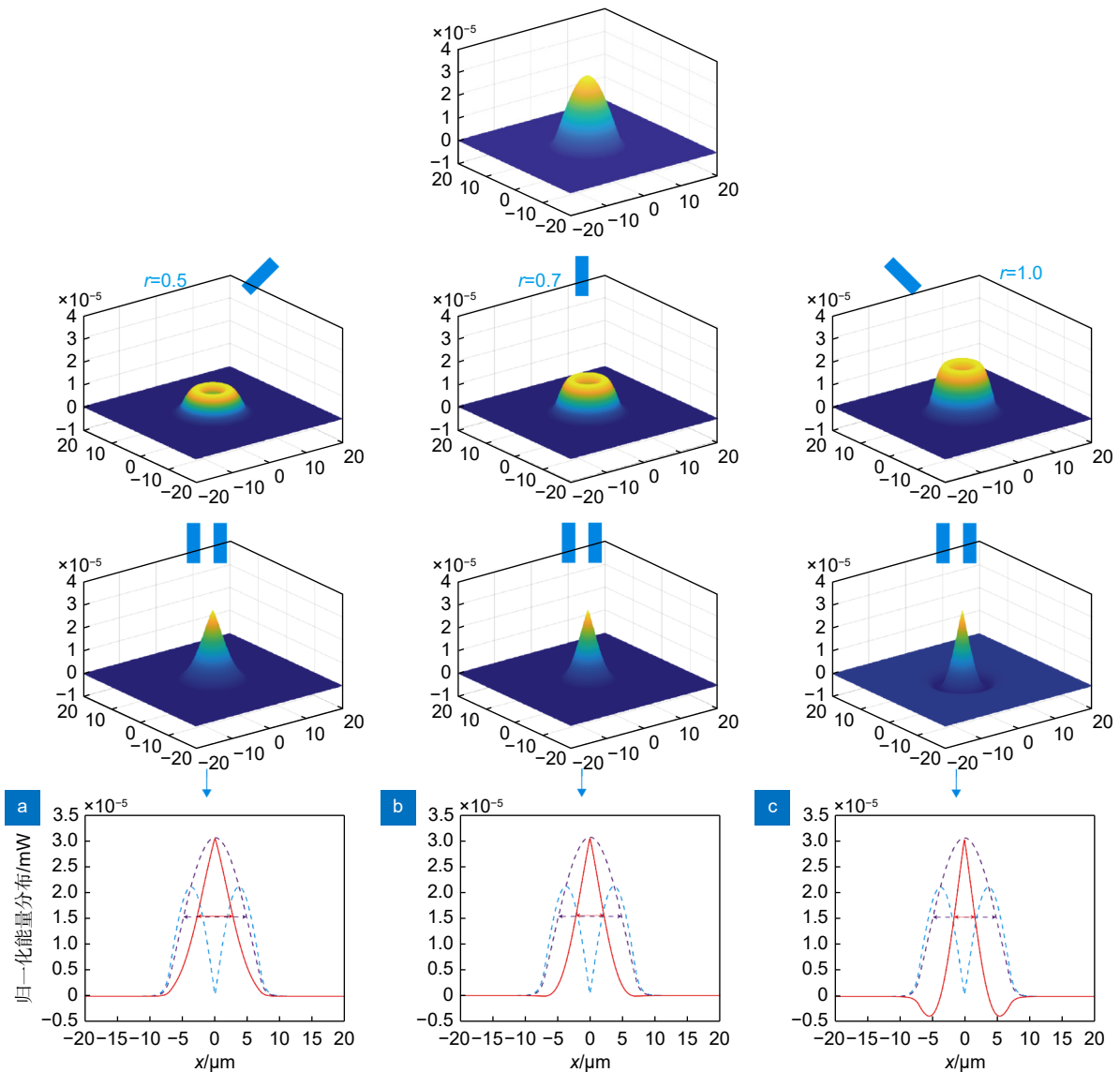


图 7 基于光纤 MSC 的 FED 成像系统中不同加权系数下, 在 MSC 输出口获得的实心光斑 (紫色虚线)、空心斑光场 (蓝色虚线)、等效合成光斑光场 (红色实线) 分布图。(a) $r=0.5$; (b) $r=0.7$; (c) $r=1$

Fig. 7 Optical field distribution of solid spot (purple dashed line), hollow spot (blue dashed line), and equivalent spot (red solid line) in the FED imaging system based on the fiber MSC with different weighting coefficients, obtained at the output end of MSC. (a) $r=0.5$; (b) $r=0.7$; (c) $r=1$

高全宽为 $9.7 \mu\text{m}$ 。分别减去 0.5 倍、0.7 倍和 1 倍的归一化 LP_{11} 模场后, 所得的等效光场的半高全宽分别为 $5.5 \mu\text{m}$ 、 $4.3 \mu\text{m}$ 、 $3.2 \mu\text{m}$ 。可见随着式 (5) 中加权系数 r 的增大, 所得等效光场的半高全宽会逐渐缩小。但是这并不意味着 FED 系统的分布率可以无限优化, 如图 7(c) 所示, 当 $r=1$ 时, 虽然等效光斑的半高全宽已经小于原实心光斑的三分之一, 但是等效光斑的周边区域已经被减为负值, 由于扫描共聚焦显微镜的成像过程相当于扫描光斑与样品图像的卷积, 等效扫描光斑中负值的存在会导致最终成像结果中有用信息的缺失。

为获得最佳的成像质量, 需要在等效光斑的半高全宽尽可能小的情况下保证其中不会出现复制的影响。在理想的理论计算结果中, 本系统的最优加权系数 r 为 0.7, 此时等效扫描光斑的半高全宽约为原实心光斑的 0.44 倍。在实际系统中, 由于光纤输出的模场分布形式不可能与理论计算完全一致, 且透镜组的缩放过程会引入某些相差的影响, 所以需要在理论最优加权系数 $r=0.7$ 的基础上进行小幅调整, 通过对金颗粒样品的扫描成像结果进行多组不同加权系数的数据处理, 最终确定实际最优的加权系数。

3 实验结果

首先采用金颗粒扫描成像的结果, 如图 8 所示。样品中金颗粒直径在 150 nm 至 600 nm 不等, 图 8(a) 是 FED 系统采用实心光斑进行第一次扫描取得的结果。图 8(b) 是 FED 系统采用空心光斑进行第二次扫描取得的结果。由于扫描成像结果相当于扫描光斑的强度分布与实际样品图像的卷积, 而金颗粒的尺寸很小, 可近似于单脉冲信号, 所以图中对金颗粒的成像结果能够反映出扫描光斑的光强分布特性, 第一次扫描结果中每个金颗粒所在位置呈现为一个实心圆斑, 第二次扫描结果中每个金颗粒所在位置呈现为一个空心环形斑。图 8(c) 是将两次扫描数据进行加权相减后最终生成的图像。通过对比可见, 经过 FED 处理的

图像中, 金颗粒的成像尺寸明显减小, 一些位置临近的金颗粒在经过 FED 处理的图像中更容易被独立分辨出来, 如图 8(a1) 和图 8(c1) 的放大区域: 图中左下角的两颗临近的金颗粒在仅用实心光斑扫描的图像中已经交叠在一起, 而经过 FED 处理后则可清晰分辨出两颗独立的金颗粒; 右上角两颗临近的金颗粒中左侧的一颗在仅用实心光斑扫描时成像的直径约为 1.17 μm , 而经过 FED 处理后成像的直径约为 560 nm, 证明 FED 系统扫描成像的分辨率较传统扫描共聚焦显微镜的分辨率提升到 2 倍以上。另外, 采用普通扫描共聚焦显微镜进行成像时, 常会因背景中一些杂质的散射光影响对实际样品的观测, 如图 8(a2) 所示的放大区域, 此时由于杂质对于环形光的散射要比对实心光的散射效果弱得多, 所以在图 8(b2) 中的对应区

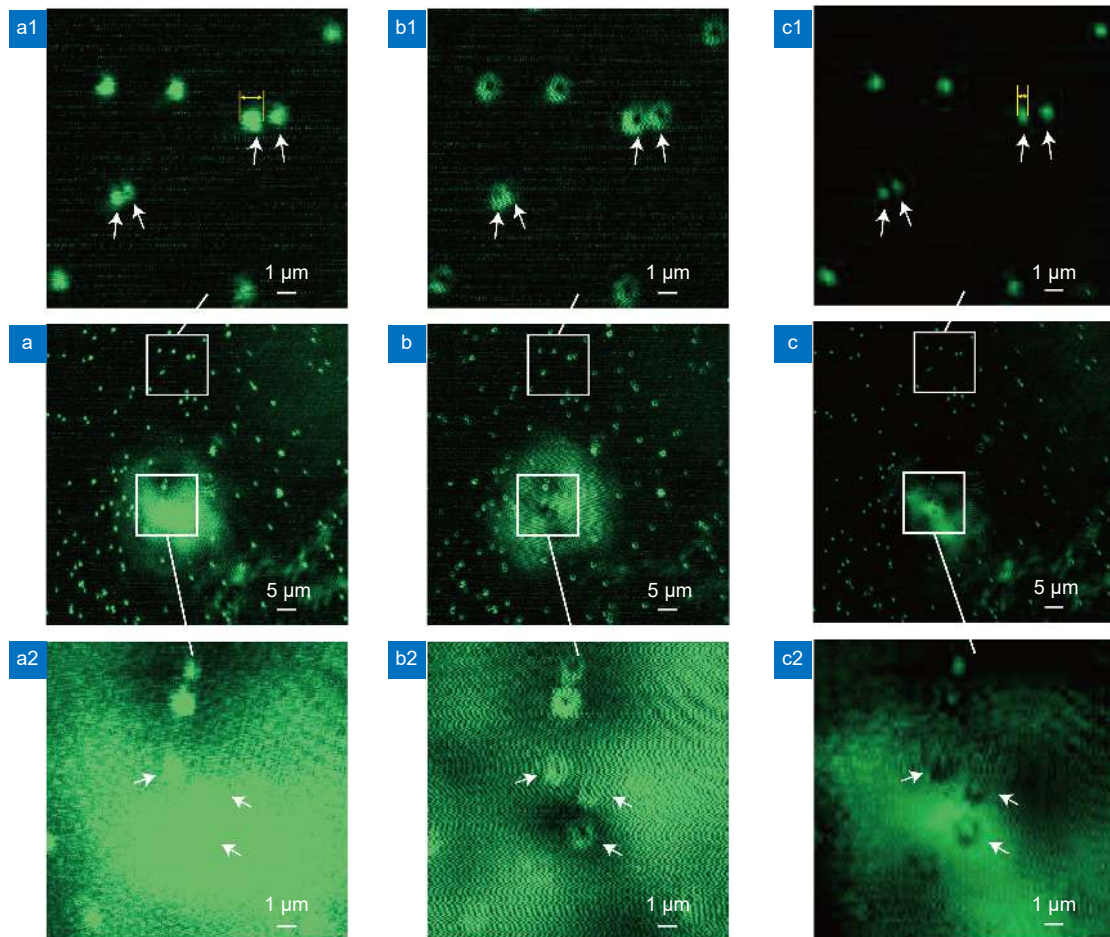


图 8 应用基于光纤 MSC 的 FED 系统对金颗粒的扫描成像结果。(a) 通过实心光斑扫描; (b) 通过环形光斑扫描; (c) 将图 (a) 和图 (b) 进行加权相减后获得的金颗粒样品像。图 (a1-c1)、(a2-c2) 分别为图 (a-c) 中两个局部的放大图

Fig. 8 Imaging result of gold particles using the FED system based on the fiber MSC. (a) Solid spot scanning; (b) Donut-shaped spot scanning; (c) Image of gold particle samples obtained by weighted subtraction of Figs. (a,b). Figures (a1-c1) and (a2-c2) are enlarged views of two different areas in Figs. (a-c), respectively

域仍能清晰地从背景噪声中分辨出金颗粒成像的环形光斑。在经过 FED 数据处理后, 图 8(c2) 中的该区域内, 在比较明显的背景噪声中, 样品的信息被从背景中提取出来, 可见, 本文所提出的方法可以在较大背景中对样品信息进行提取, 相对于传统共聚焦显微镜, 极大地提升了系统的成像质量。

在实际工作中, 光纤 MSC 输出的 LP_{11} 模式纯度会对最终成像结果产生较大影响。首先, 如果输出的 LP_{11} 模式光场中混杂有一部分基模 LP_{01} 模式光场, 将导致最终输出的环形扫描光斑中暗芯部分的消光比无法达到 0。这样在经过 FED 系统加权相减的数据处理过程后, 相当于位于扫描光斑中心部分的有效信息被削弱, 甚至在合成图像中丢失某些样品细节信息。其次, 如果输出的 LP_{11} 模式光场中两正交偏振方向的分量不完全相等, 会导致环形扫描光斑的实际光场分布并不是完美的圆环形态。这样在经过 FED 系统数据处理后, 相当于等效的扫描光斑不再是完美的圆斑, 而更接近椭圆斑, 会使合成的成像结果在细节上产生一定的畸变。如图 8(c1) 中, 金颗粒样品的最终成像结果在竖直方向上均有略微的拉长, 即为环形扫描光斑模式纯度不足带来的影响。

图 9 为应用 MSC-FED 系统对纳米级的无荧光标记聚合物线对矩阵结构进行扫描成像的结果。该结构

由一系列线对组成, 其中每根线段的长度约为 $3\ \mu\text{m}$, 宽度约为 $150\ \text{nm}$, 每对线对的间距由 $50\ \text{nm}$ 到 $250\ \text{nm}$ 不等。这些线对排成 4 列, 每列由 11 对线对组成。图 9(a) 是 FED 系统采用实心光斑进行第一次扫描取得的结果, 在该图像中下半部分的线对能够被清晰分辨, 而上半部分尤其是第 1 列与第 2 列的最上面 3 组线对的细节信息比较模糊, 甚至无法区分开线对中的两根线段。而在图 9(b), 即 FED 系统采用空心光斑进行第二次扫描取得的结果中, 则刚好携带有这些细节信息。在经过 FED 数据处理后得到的图像中可以观察到很多结构细节信息, 整个线对矩阵中的每对线对均可被清晰分辨开, 并且图像中的背景噪声得到了很好的抑制, 使线对矩阵结构在图像中凸显出来, 如图 9(c) 所示。

4 结论

本文详细介绍了一种能够产生空心光斑的光纤 MSC 器件, 该器件利用光纤的模式特征, 实现了基于波导的空心光束调控。通过该光纤 MSC 器件的两个不同输入端输入光, 将会分别以光纤 LP_{01} 模式和 LP_{11} 模式从 MSC 的同一输出端输出, 实现了空心光束和传统实心高斯光束的绝对同心。进一步地, 应用该 MSC 器件搭建了一套用于无标记样品的 MSC-

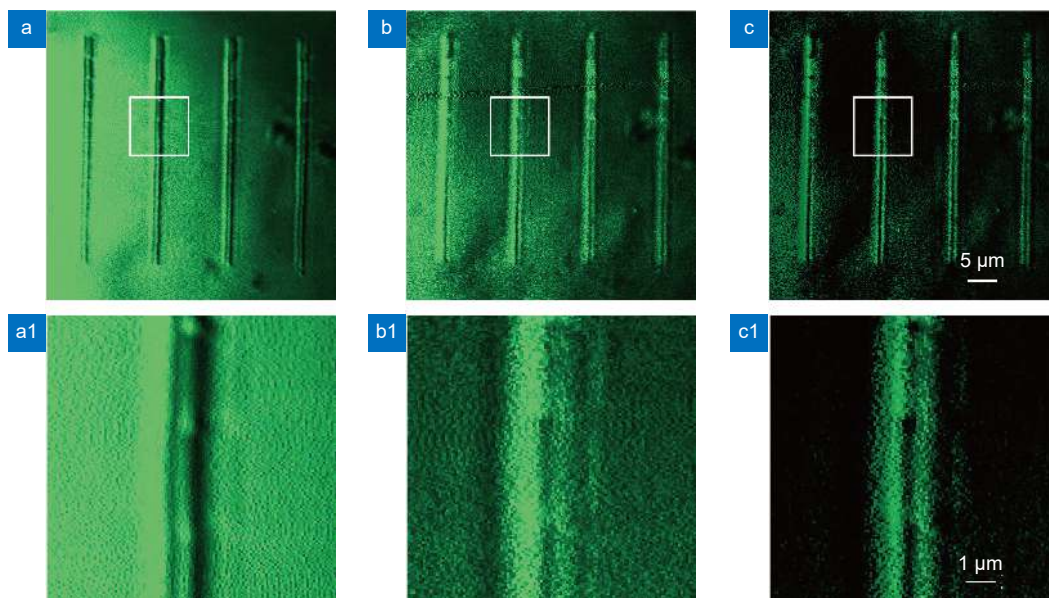


图 9 应用基于光纤 MSC 的 FED 系统对纳米级线对的扫描成像结果。(a) 通过实心光斑扫描; (b) 通过环形光斑扫描;

(c) 通过将图 (a) 和图 (b) 进行加权相减后获得的纳米线对样品像。图 (a1-c1), 分别为图 (a-c) 中局部的放大图

Fig. 9 Imaging result of nano-scale wire pairs using the FED system based on fiber MSC. (a) Solid spot scanning; (b) Donut-shaped spot scanning; (c) Image of nano-scale wire pairs obtained by weighted subtraction of Figs. (a, b)

FED 成像系统。相对于传统 FED 系统采用可编程液晶器件或固定相位板产生空心光斑的方法, 本方法无需昂贵的器件, 极大地节约了成本。无需空间光传输系统中的合束调校, 即可实现两种光斑的绝对共轴, 从根本上消除了光斑重合误差。系统采用波长为 532 nm 的连续激光作为光源, 对直径约 150 nm 的金颗粒以及最小间距约 50 nm 的无荧光标记聚合物线对进行成像测试, 相对于传统共聚焦成像, 分辨率和图像质量有了极大提升。本文报道的 MSC-FED 系统结构简单紧凑, 可实现优于传统扫描共聚焦显微镜 2 倍的成像分辨率, 推进了无标记显微成像技术的发展。鉴于本系统中采用的光纤 AOM 器件的开关性能, 实测光纤 MSC 输出实心斑和空心斑的切换速度可达 10 MHz 以上, 未来系统方案可做进一步优化: 在扫描振镜的每个扫描点切换一次实心斑和空心斑照明, 从而实现通过扫描振镜的一次遍历扫描同时获得实心斑和空心斑照明下的两幅扫描图像的功能, 进一步提升系统成像速率以及对高速运动样品的成像能力。

参考文献

- [1] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Opt Lett*, 1994, **19**(11): 780–782.
- [2] Gu M, Kang H, Li X P. Breaking the diffraction-limited resolution barrier in fiber-optical two-photon fluorescence endoscopy by an azimuthally-polarized beam[J]. *Sci Rep*, 2014, **4**: 3627.
- [3] Yan L, Kristensen P, Ramachandran S. All-fiber STED microscopy illumination system[C]//*Proceedings of 2016 Conference on Lasers and Electro-Optics*, San Jose, 2016. <https://ieeexplore.ieee.org/document/7788790>.
- [4] Luo M Y, Sun D Q, Yang Y J, et al. Three-dimensional isotropic STED microscopy generated by 4π focusing of a radially polarized vortex Laguerre–Gaussian beam[J]. *Opt Commun*, 2020, **463**: 125434.
- [5] Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)[J]. *Nat Methods*, 2006, **3**(10): 793–796.
- [6] Kamiyama D, Huang B. Development in the STORM[J]. *Dev Cell*, 2012, **23**(6): 1103–1110.
- [7] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642–1645.
- [8] Shroff H, White H, Betzig E. Photoactivated localization microscopy (PALM) of adhesion complexes[DB/OL]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2008. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0421s58>.
- [9] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy[J]. *J Microsc*, 2000, **198**(Pt 2): 82–87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>.
- [10] Heintzmann R, Cremer C G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating[J]. *Proc SPIE*, 1999, **3568**: 185–196.
- [11] Kuang C F, Li S, Liu W, et al. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy[J]. *Sci Rep*, 2013, **3**: 1441.
- [12] Zhang Z J, Xu X, Wang J X, et al. Review of the development of light sheet fluorescence microscopy[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, **50**(5): 220045.
张子建, 徐欣, 王吉祥, 等. 光片荧光显微镜研究进展[J]. *光电工程*, 2023, **50**(5): 220045.
- [13] Xiao Y T, Chen L W, Pu M B, et al. Improved spatiotemporal resolution of anti-scattering super-resolution label-free microscopy via synthetic wave 3D metalens imaging[J]. *Opto-Electron Sci*, 2003, **2**(11): 230037.
- [14] Chen L W, Zhou Y, Wu M X, et al. Remote-mode microsphere nano-imaging: new boundaries for optical microscopes[J]. *Opto-Electron Adv*, 2018, **1**(1): 170001.
- [15] Chen X S, Du W J, Lou Z L, et al. Label-free far-field subdiffraction imaging based on hyperbolic metamaterial[J]. *Opto-Electron Eng*, 2022, **49**(11): 220056.
陈雪松, 杜文娟, 楼志浪, 等. 基于光频双曲超材料的无标记远场超分辨显微成像[J]. *光电工程*, 2022, **49**(11): 220056.
- [16] Kireev A N, Graf T. Vector coupled-mode theory of dielectric waveguides[J]. *IEEE J Quantum Electron*, 2003, **39**(7): 866–873.
- [17] Volpe G, Petrov D. Generation of cylindrical vector beams with few-mode fibers excited by Laguerre–Gaussian beams[J]. *Opt Commun*, 2004, **237**(1-3): 89–95.
- [18] Quabis S, Dorn R, Leuchs G. Generation of a radially polarized doughnut mode of high quality[J]. *Appl Phys B*, 2005, **81**(5): 597–600.
- [19] Kireev A N, Graf T. Symmetric vector coupled-mode theory of dielectric waveguides[J]. *Opt Commun*, 2005, **244**(1-6): 25–35.
- [20] Xiao J B, Sun X H. Full-vectorial mode solver for anisotropic optical waveguides using multidomain spectral collocation method[J]. *Opt Commun*, 2010, **283**(14): 2835–2840.
- [21] Luo H, Wang G R, Yuan L B. A special three-layer step-index fiber for building compact STED systems[J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 8455.
- [22] Zou J H, Wang H J, Li W W, et al. Visible-wavelength all-fiber vortex laser[J]. *IEEE Photonics Technol Lett*, 2019, **31**(18): 1487–1490.
- [23] Zhang W D, Huang L G, Wei K Y, et al. High-order optical vortex generation in a few-mode fiber via cascaded acoustically driven vector mode conversion[J]. *Opt Lett*, 2016, **41**(21): 5082–5085.
- [24] Yan L, Kristensen P, Ramachandran S. Vortex fibers for STED microscopy[J]. *APL Photonics*, 2019, **4**(2): 022903.

作者简介



罗昊 (1990-), 男, 博士, 之江实验室智能芯片与器件研究中心博士后, 2020 年博士毕业于哈尔滨工程大学, 多年从事新型特种光纤和光纤器件的理论和应用研究。2016 年 11 月-2018 年 1 月曾在美国南卡罗莱纳州大学交流访学, 研究 STED 超分辨显微镜与新型光纤器件相结合的关键技术。2020 年 8 月进入之江实验室从事博士后工作, 研究新型光纤器件在多通道并行的超分辨直写式光刻系统中的关键技术及应用。

E-mail: luohao_optics@sina.com



【通信作者】匡翠方 (1977-), 男, 博士, 浙江大学教授, 浙江大学光电工程研究所所长, 国家杰出青年基金获得者、浙江省“万人计划”科技创新领军人才, 美国光学学会 (OPTICA) 会员。曾主持基金委重大仪器专项基金、浙江省之江实验室重大装置项目, 参与科技部 973 项目、科技部重大仪器研发项目等 20 余项。以第一/通讯作者发表 SCI 文章论文 150 余篇。以第一发明人申请发明专利 100 多项。获得 2019 年国家科学技术发明二等奖、2019 年度王大珩光学奖-中青年科技人员光学奖、2018 年首届中国光学科技奖评选应用成果类一等奖、2020 年浙江省科学技术进步奖三等奖。

E-mail: cfkuang@zju.edu.cn



【通信作者】曾祥龙 (1977-), 男, 博士, 研究员, 上海大学特种光纤与光接入网重点实验室教授。2004 年 7 月获得上海交通大学光学理学博士学位, 2004 年至 2007 年在日本东京大学任 JSPS 外国人特别研究员, 2011 年至 2013 年在丹麦科技大学光子工程系任副教授。获得欧盟“玛丽居里”学者、上海市“东方学者”计划, 主要从事特种光纤、光纤激光技术和超快非线性光学理论和实验研究。

E-mail: zenglong@shu.edu.cn



【通信作者】朱大钊 (1987-), 男, 博士, 之江实验室智能芯片与器件研究中心研究专家, 副研究员。2018 年毕业于浙江大学光电科学与工程学院, 主要研究方向为超分辨显微成像、高通量激光纳米直写光刻技术与装置。以第一作者/通信作者发表期刊论文 10 余篇。先后主持/参与国家青年基金、省青年基金、博士后面基金、省重大项目、国家重点研发计划等项目与课题研究。

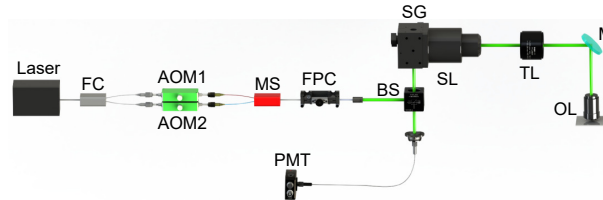
E-mail: zhudz@zhejianglab.com



扫描二维码, 获取PDF全文

Optical fiber integrated unlabeled differential super-resolution microscopic imaging system

Luo Hao¹, Hou Mengdie³, Xu Liang^{1,2}, Yang Zhenyao¹,
Kuang Cuifang^{1,2*}, Zeng Xianglong^{3*}, Zhu Dazhao^{1*}



Schematic diagram of FED imaging system based on fiber MSC

Overview: Fluorescence emission difference (FED) microscopy was first applied to fluorescent samples. However, given its basic principle, this microscopy also can perform super-resolution imaging of non-fluorescent samples. In this method, solid and hollow light spots of the same wavelength are used to image the samples respectively. An image with super-resolution details can be achieved through data processing of the two images. In traditional methods, the generation and modulation of hollow and solid light spots are based on a spatial light modulator or vortex phase plate and multiple groups of spatial optical devices, resulting in a complex system that is susceptible to external interference.

In this article, we proposed a modified FED microscopy based on a special Optical Fiber Mode Selection Coupler (MSC). The coupler has two input ports: Gaussian light beam input through one of the input ports will be converted into a vortex beam which has circular optical field distribution; Gaussian light beam input through the other input port will be converted into the fundamental mode of the fiber which remains Gaussian optical field distribution. Since the two output beams are emitted through the same fiber, the two beams naturally propagate along the same optical axis in the subsequent optical path, which solved the problem of strict alignment between hollow spot and solid spot in a traditional FED microscopy system.

In the MSC-FED system, a continuous laser beam at a wavelength of 532 nm was emitted by a semiconductor laser. The beam was firstly divided into two channels through a single-mode fiber 1×2 coupler. Two Acousto-Optic Modulators (AOM) were integrated into two fiber optical paths to achieve high-speed switching control with rising/falling edge times of less than 10 ns. After passing through AOM, light in the two channels incident into two input ports of the MSC respectively. By the switch control of AOM, light beams in two channels alternately output solid spot and hollow spot from the special MSC. The solid spot or hollow spot was used to scan the sample through the subsequent optical elements in the system.

In experiments, gold particles with a diameter of 150 nm and unlabeled polymer lines with a minimum spacing of about 50 nm were imaged to test the imaging system. The resolution of the imaging system shows great improvement compared to conventional scanning confocal microscopy.

Luo H, Hou M D, Xu L, et al. Optical fiber integrated unlabeled differential super-resolution microscopic imaging system[J]. *Opto-Electron Eng*, 2023, 50(12): 230181; DOI: [10.12086/oe.2023.230181](https://doi.org/10.12086/oe.2023.230181)

Foundation item: Project supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LQ22F050017), National Natural Science Foundation of China (62105298), China Postdoctoral Science Foundation (2021M692954), and Major Scientific Project of Zhejiang Lab, China (2020MC0AE01).

¹Research Center for Intelligent Chips and Devices, Zhejiang Lab, Hangzhou, Zhejiang 311121, China; ²State Key Laboratory of Extreme Photonics and Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China; ³Key Laboratory of Specialty Fiber Optics and Optical Access Networks, Shanghai University, Shanghai 200444, China

* E-mail: cfkuang@zju.edu.cn; zenglong@shu.edu.cn; zhudz@zhejianglab.com