

# 基于一体化微球物镜的超分辨成像系统\*

宋扬<sup>1)2)</sup> 杨西斌<sup>2)†</sup> 闫冰<sup>2)</sup> 王驰<sup>1)</sup> 孙建美<sup>1)</sup> 熊大曦<sup>2)</sup>

1) (上海大学机电工程与自动化学院, 上海 200444)

2) (中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 光与健康研究中心, 苏州 215163)

(2019年12月30日收到; 2020年4月14日收到修改稿)

利用直径微米量级的透明微球与传统光学显微镜相结合, 可以在白光下实现超分辨成像. 目前大部分研究是将微球直接播撒到样品表面, 由于微球位置的随机性和不连续性导致无法实现特定区域的完整成像, 极大限制了该技术的使用范围. 使用微探针或微悬臂黏附微球, 通过三维位移台精确控制微球位置, 一定程度上解决了上述问题, 但是需要对微球位置进行精准操控. 本文提出了一种结构稳定、参数可控、简单易用的基于一体化微球物镜的超分辨成像系统, 对微球与物镜进行了一体化安装设计, 通过设计侧视成像及位置反馈系统实现了对微球、物镜和样品三者之间距离的精准控制, 结合通用的显微成像系统, 实现了对可控特定区域的超分辨成像. 该系统将普通显微物镜 (40 $\times$ , NA 0.6) 的分辨能力提高了 4.78 倍, 最高可以看到 100 nm 的样品特征. 该一体化物镜可以搭配普通光学显微系统使用, 实现超分辨成像, 提高了微球超分辨技术的通用性, 在亚衍射极限样品的超分辨成像方面具有广泛的应用价值.

**关键词:** 微球超分辨成像, 一体化物镜, 侧视成像反馈系统

**PACS:** 42.15.Eq, 42.30.Va, 42.70.Mp, 42.79.Bh

**DOI:** 10.7498/aps.69.20191994

## 1 引言

传统光学显微镜受到衍射极限的限制, 最高横向分辨率约为 200 nm, 难以观测亚衍射极限样品的特征. 近年来, 多种超分辨荧光显微成像技术逐步出现, 根据不同的成像原理, 超分辨显微成像技术可分为两大类: 1) 利用单分子定位方法突破衍射极限, 包括随机光学重建显微术 (STORM)<sup>[1]</sup>、光激活定位显微术 (PALM)<sup>[2]</sup> 和 fPALM 技术<sup>[3]</sup> 等; 2) 改变光源照明方式, 调制点扩散函数 (PSF) 来实现分辨率的提高, 例如受激发射损耗显微术 (STED)<sup>[4]</sup>、结构光照明显微术 (SIM)<sup>[5]</sup> 和饱和 SIM 技术<sup>[6]</sup> 等. 然而, 上述超分辨荧光技术受限于荧光分子自身特性, 无法在白光照明下实现超分辨

成像.

Wang 等<sup>[7-9]</sup> 提出了微球超分辨成像技术, 借助直径微米级的透明电介质微球, 利用微球对入射光的亚波长聚焦特性, 传统光学显微镜可以在白光下实现 50 nm 分辨率的成像, 如图 1(a) 所示, 为实现超分辨成像提供了一种全新的方法. 2013 年, Li 等<sup>[10]</sup> 将微球浸没水中, 实现了对 75 nm 腺病毒的白光成像; Hao 等<sup>[11,12]</sup> 和 Darafsheh 等<sup>[13-15]</sup> 直接将微球半浸没或全浸没在酒精或异丙醇等介质中, 但是这些方式只能对样品进行一次性观察, 同时浸没介质的易挥发性严重影响观察的稳定性; 随后, Darafsheh 等<sup>[16,17]</sup> 改进微球使用方法, 利用硅胶将钛酸钡微球封装成硅胶薄膜, 但硅胶薄膜与样品的粘黏作用不可避免会损坏样品表面. 在这些使用方式中, 微球相对样品固定, 并随机分布在被观

\* 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2017YFC0109900, 2018YFC0114800)、国家自然科学基金 (批准号: 61405238) 和江苏省重点研发计划 (批准号: BE2018666) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yangxb@sibet.ac.cn

测样品表面, 这些使用方式导致了微球位置的随机性和不连续性, 无法实现特定区域的完整成像, 而且待测样品被微球及浸没介质污染, 极大限制了该技术的使用范围.

近年来, 国内外学者为了扩展微球超分辨成像技术的应用范围, 进行了大量改进研究. 为了实现对微球位置的控制, 2013年, Krivitsky 等<sup>[18]</sup>通过气压吸附或胶水固化等方式将微球固定在玻璃微管尖端上, 实现了对间距 73 nm 的分割正方形的超分辨结构观察; 文献<sup>[19–21]</sup>中, 研究者先后使用毛细管微悬臂和 AFM 微悬臂黏附直径 7.5  $\mu\text{m}$  的微球, 实现了对 DVD 光盘的高分辨结构和刻蚀光栅的超分辨结构的观察; 2016年, Wang 等<sup>[22]</sup>借助原有 AFM 系统, 将微球黏附在 AFM 探针尖端上, 利用 AFM 的等高扫描模式和接触扫描模式,

在短时间内实现大范围超分辨成像, 同时避免了探针对样品的破坏, 如图 1(b) 所示; 2018年, 陈涛等<sup>[23]</sup>将钛酸钡玻璃微球黏附在钨探针上, 使用多轴微动平台对微球进行精确操作实现了 130 nm 的超分辨成像. 这些装置都可以对特定区域进行超分辨成像, 但是微悬臂或者微探针的脆弱性会导致其发生损坏. 2017年, Yan 等<sup>[24]</sup>通过自制透镜适配器将传统的显微镜物镜与微球集成一体, 实现了超分辨成像, 但是该适配器由 3D 打印而成, 精度不高, 微调难度较大, 同时无法对成像参数进行评价. 2018年, 新加坡国立大学 Chen 等<sup>[25]</sup>使用适配器将物镜与微球结合为一体, 开发了一款微球纳米成像平台, 如图 1(c) 所示, 该设计可以搭配不同类型的物镜和不同种类微球, 利用步进电机调节微球与物镜之间的距离. 作者使用浸油物镜 (100 $\times$ , NA

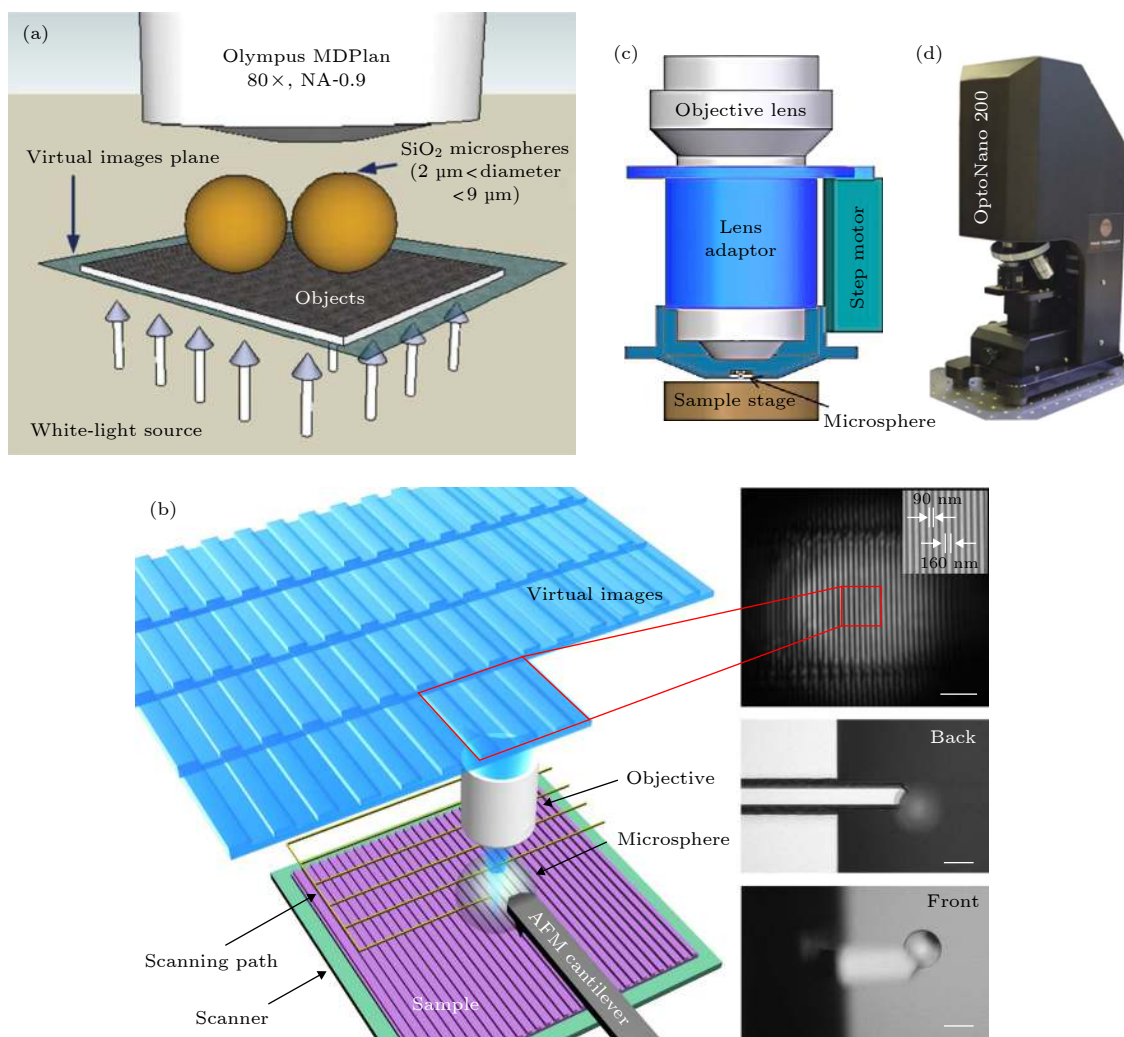


图 1 (a) 直接播撒微球成像示意图; (b) AFM 探针操控微球成像示意图; (c) 微球通用镜头适配器; (d) 微球辅助显微镜 OptoNano 200  
 Fig. 1. (a) Schematic of spread the microspheres; (b) Schematic of AFM probes control microspheres; (c) The universal lens adaptor for the microsphere; (d) Microsphere assisted microscopy OptoNano 200.

1.4) 和直径 20  $\mu\text{m}$  的二氧化硅微球在白光下观测到了 23 nm 的纳米点对特征. 在此基础上, 2020 年, Phaos 等<sup>[26]</sup> 推出了 OptoNano 系列微球辅助显微镜, 如图 1(d) 所示, 在现有的 OptoNano 200 产品中, 将微球与物镜 (50 $\times$ , NA 0.55) 结合为一体, 经分辨率板标定, 可以实现 137 nm 的分辨率.

目前存在的微球使用方式各有优势, 但是还未解决系统的易用性和成像参数的可控性等难题. 本文理论分析了微球聚焦光斑直径对超分辨能力的影响, 将微球与现有物镜整合一体, 集成侧视成像反馈系统, 实现了白光下对亚衍射极限样品的实时观测, 并对系统的成像参数进行分析. 理论和实验结果表明, 该系统可以在空气中实现超分辨成像, 极大提升了物镜性能, 精简了系统结构, 提高了微球的适用性, 降低了成像系统成本.

## 2 理论分析及仿真

微球透镜的超分辨成像能力被广泛研究, Wang 等<sup>[7]</sup> 认为通过微球聚焦产生的光子纳米射流效应使其能够实现超分辨成像, 该射流长度可达几个甚至十几个波长, 其能量最大处被定义为微球焦点, 焦点处的半高宽被称为聚焦光斑直径, 该直径可以小于半个波长. 文献表明<sup>[27–29]</sup>, 成像分辨率会受微球及周围介质的光学参数影响, 包括微球尺寸、折射率、入射光源、周围介质的折射率和与衬底相互作用等因素. 研究发现, 更小尺寸的微球 (如 <10  $\mu\text{m}$ ) 可以获取更高的成像分辨能力, 这是由于微球在接触样品成像实验中, 其产生的光子纳米射流更接近微球与样品的交界面, 此时近场环境下的倏逝波可以被更有效地捕获, 并通过微球转换成可以被采集的传播波. 然而, 由于小尺寸的微球通常成像视场非常小, 工作距离很短 (基本接触条件下成像), 所以实用性较低, 不利于技术的进一步发展. 因此, 基于此考虑, 可以选用较大的微球. 本文采用较大尺寸的微球, 在保证分辨率的基础上, 试图增加其工作距离, 从而做到非侵入式成像, 更好地适应多样化的样品观测.

综合以上因素, 确定相关系统参数对微球成像能力进行仿真, 本文选用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) (折射率  $n_1 = 1.4$ ) 作为封装介质, 使用钛酸钡 (BTG) (Cospheric, 直径  $D_1 = 100 \mu\text{m}$ , 折射率  $n_2 = 1.9$ ) 微球进行成像仿真分析, 设定仿真光源为波长

470 nm 的平面波. 在对微球的仿真中, 光波穿过半封装于 PDMS 的钛酸钡微球射入空气中, 由于微米量级的微球对光波的谐振作用, 光波的传输过程满足以下方程:

$$\nabla^2 \mathbf{E} + k^2 \mathbf{E} = 0, \quad (1)$$

其中  $\mathbf{E}$  是光矢量,  $k$  是波数,  $k = \omega\sqrt{\mu\varepsilon}$ .  $\mu$  与  $\varepsilon$  分别是材料的磁导率和介电常数,  $\omega$  是光波的角频率. 在该模型中, 外边界均采用散射边界条件, 网格大小小于  $\lambda/4$  以保证模型求解的精确度.

首先研究半封装于 PDMS 中的不同直径 BTG 微球形成的光子纳米射流 (photonic nanojet, PNJ) 的状态. 如图 2(a) 所示, 蓝、绿、红三条曲线分别代表直径 50, 75 和 100  $\mu\text{m}$  的 BTG 微球形成的光子纳米射流沿  $Z$  轴方向的光强变化曲线. 由图可知, 随着微球直径的增加, 光子纳米射流 PNJ 越长, 微球焦距越长, 且焦点处能量越大. 图 2(b) 表示三种直径微球形成的光子纳米射流半高宽 (FWHM) 在工作距离增加时的变化状态, 其中黑色直线表示衍射极限 ( $\lambda/2 = 0.235 \mu\text{m}$ ), 可以看到, 直径越大的微球可以在越长的工作距离下突破衍射极限, 如 100  $\mu\text{m}$  微球实现超分辨的工作距离 <13  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  微球的工作距离 <10  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$  微球的工作距离 <7  $\mu\text{m}$ , 并且在超出此工作距离后半高宽迅速提升, 伴随着明显的波动. 在三种尺寸微球的仿真结果对比中, 直径 100  $\mu\text{m}$  微球在较长工作距离内保持 FWHM <  $\lambda/2$ , 呈现出更稳定的工作状态, 这也有助于实现更稳定的成像质量.

同时, 对直径 100  $\mu\text{m}$  微球及其周围的电场强度分布进行仿真, 结果如图 2(c) 所示, 图中显示光线经过半封装微球聚焦后形成光子纳米射流, 该射流位于微球正下方一定距离的空气中, 且中间位置存在明显断层. 正好与图 2(a) 能量曲线中两个波峰之间的波谷相对应, 两个波峰的强度分别是入射光的 7871 倍和 7797 倍, 对应的工作距离分别为 14.3 和 21  $\mu\text{m}$ . 第一个波峰即为微球的焦点, 在焦点范围内, 微球聚焦光斑直径小于  $\lambda/2$  时, 可以实现超分辨成像. 后一个波峰是由半浸没微球的 PDMS 对光线的汇聚产生的, 由于其聚焦光斑直径较大, 工作距离太长, 此时微球已经失去了超分辨能力. 在图 2(b) 中, 聚焦光斑在工作距离 2  $\mu\text{m}$  处的直径最小, 值为 150 nm ( $\lambda/3.13$ ), 同时聚焦光斑直径随工作距离的增加而不断增大, 在 13  $\mu\text{m}$

处超过  $\lambda/2$ , 随后聚焦光斑迅速发散, 聚焦效果逐渐消失. 总而言之, 直径  $100\ \mu\text{m}$  的半封装 BTG 微球在小于  $13\ \mu\text{m}$  的工作距离内具有超分辨能力.

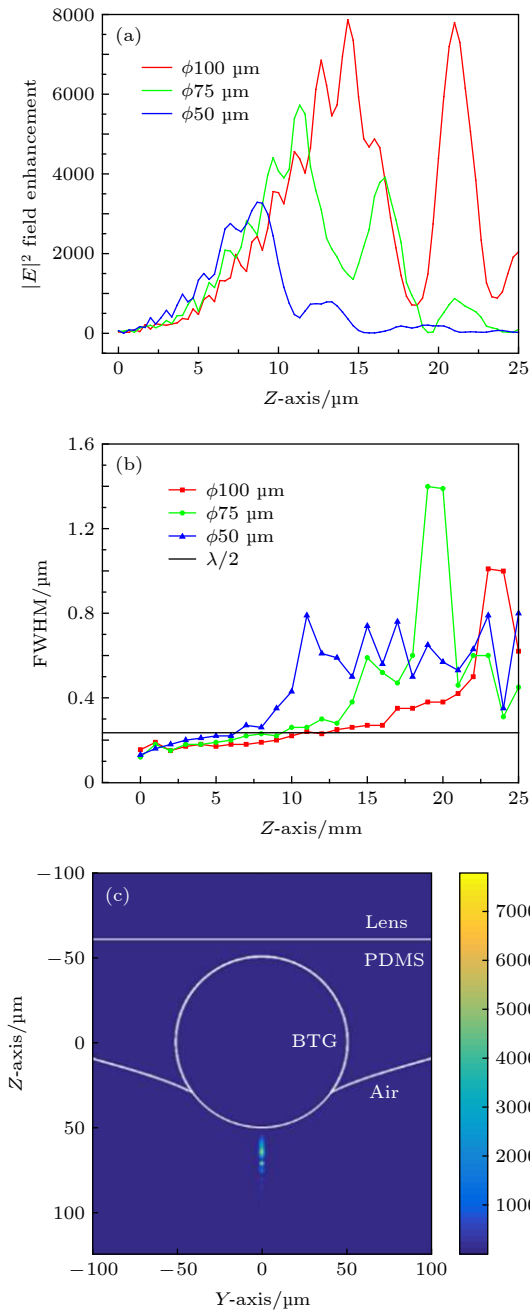


图 2 (a) 直径 50, 75 和  $100\ \mu\text{m}$  的 BTG 微球形成的光子纳米射流沿 Z 轴方向的光强变化曲线; (b) 三种直径微球形成的光子纳米射流的半高宽变化状态; (c) 在波长  $470\ \text{nm}$  的光源下, 直径  $100\ \mu\text{m}$  微球形成的光子纳米射流状态

Fig. 2. (a) Intensity curve value in Z-axis direction of the photonic nanojet formed by BTG microspheres with diameters of 50, 75 and  $100\ \mu\text{m}$ ; (b) FWHM of the photonic nanojet formed by BTG microspheres; (c) The photonic nanojet formed by  $100\ \mu\text{m}$  microspheres at the wavelength of  $470\ \text{nm}$ .

### 3 实验系统

使用仿真中所用的 BTG 微球和 PDMS 半封装介质来制作一体化微球物镜并装载到实验系统中.

实验装置及原理图如图 3 所示, 实验装置由显微成像系统和侧视成像反馈系统组成. 在显微成像系统中, 使用主波长  $470\ \text{nm}$  的 LED 光源进行照明, 照明光路使用孔径光阑和视场光阑进行斜照调节, 以提高微球成像质量, 使用 CMOS 相机 (OPLINIC, MSC180, 分辨率  $4912 \times 3684\ \text{pixels}$ , 像素尺寸  $1.25\ \mu\text{m} \times 1.25\ \mu\text{m}$ ) 接收显微图像信息. 侧视成像模块由 CMOS 相机 (Mshot, MS23, 分辨率  $1920 \times 1200\ \text{pixels}$ , 像素尺寸  $5.86\ \mu\text{m} \times 5.86\ \mu\text{m}$ ) 搭配光学变焦镜头 (XDS-10 A, 光学放大率  $2.8\text{--}18\times$ , 工作距离  $32\ \text{mm}$ ) 组成, 与一体化物镜和电动位移台 (Shinopto, Nanomotor SNM01, 步长  $<30\ \text{nm}$ ) 相结合构成侧视成像反馈系统, 该系统可以辅助制作一体式微球物镜, 同时在使用时对微球成像参数进行精准调节. 与 OptoNano 200 相比, 该装置所具备的侧视成像反馈系统可以在成像过程中实时观测微球状态, 以实现对接微球的精准操控, 避免微球或样品造成损坏.

一体化微球物镜如图 4(a) 所示, 该物镜由普通物镜 ( $40\times$ , NA 0.6, WD =  $4\ \text{mm}$ )、旋转套筒和固定套筒组成, 使用硅胶将微球封装在旋转套筒的平凸透镜 (Thorlabs, LA1700, 直径  $D_2 = 6\ \text{mm}$ , 焦距  $f = 30\ \text{mm}$ , 中心厚度  $1.8\ \text{mm}$ , 曲率 0.61) 上, 套筒之间使用超细牙螺纹 (螺距  $P = 0.35\ \text{mm}$ ) 连接以实现轴线方向的精细可调. 制作过程如图 4(b) 所示, 主要包括制作分离的金属套筒, PDMS 的滴加和旋涂 ( $2000\ \text{rpm}$ ,  $1\ \text{min}$ , 形成  $10\ \mu\text{m}$  厚涂层), 微球的黏附和加热固化 ( $90\ \text{C}$ ,  $30\ \text{min}$ ). 其中, 需要将物镜安装在显微系统上, 使用侧视成像反馈系统黏附微球. 侧视成像反馈系统如图 4(c) 所示, 微球黏附过程由侧视成像系统拍摄, 如图 4(d) 所示, 首先移动微球至物镜正下方, 此时由于 LED 光源的照射, 微球上呈现亮斑. 接着平凸透镜下压, 直至微球被 PDMS 吸附, 吸附完成后将位移台下移以避免二次接触已黏附的微球. 这样就可以将微球与物镜整合一体化, 实现特定区域的超分辨成像.

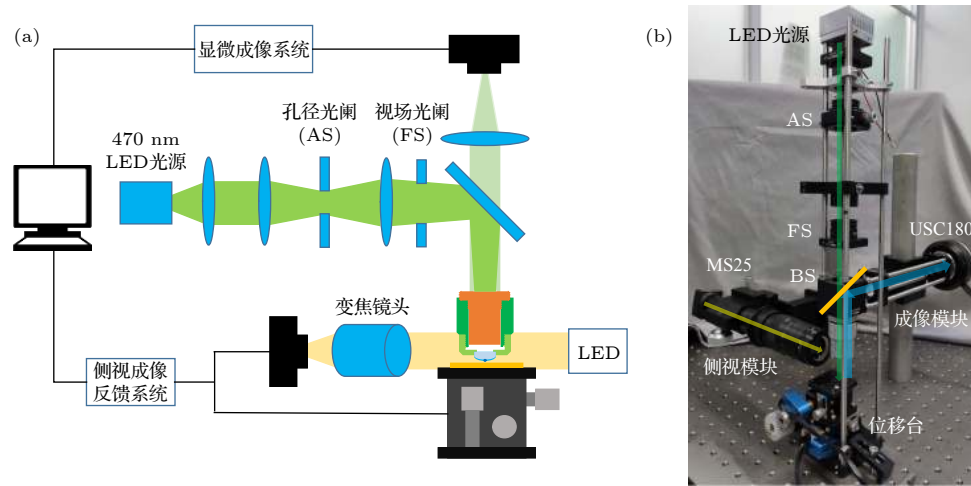


图 3 微球成像系统原理图及实验装置图

Fig. 3. Schematic and experimental set-up diagram of microsphere imaging system.

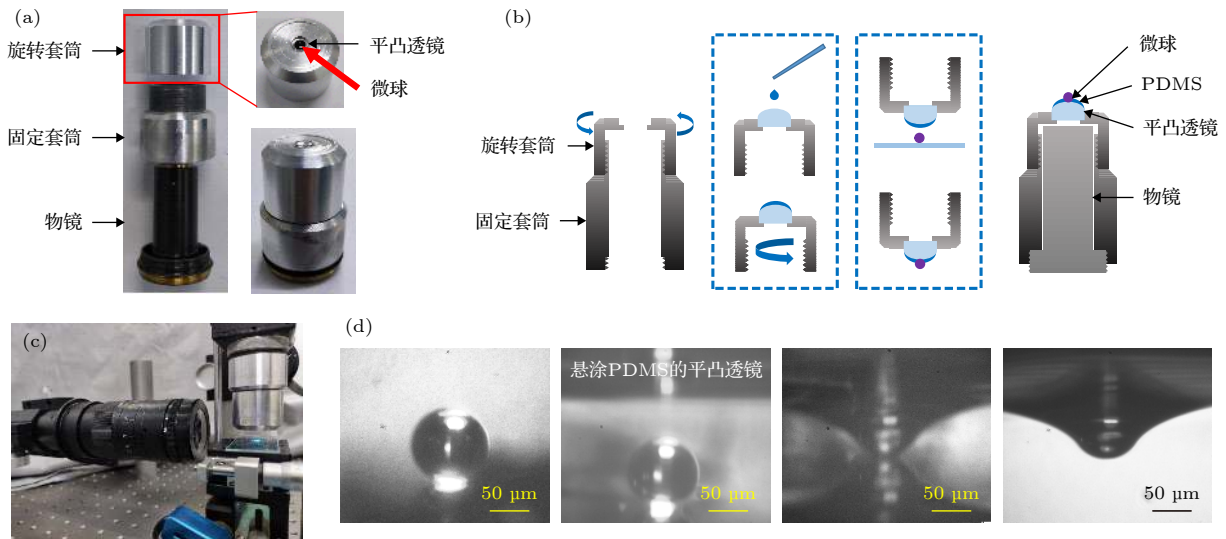


图 4 (a) 超分辨微球物镜实物图; (b) 超分辨微球物镜的制作过程, 主要包括 1) 套筒的制作, 2) PDMS 的涂覆, 3) 微球的黏附, 4) 一体化物镜; (c) 侧视成像反馈系统实物图; (d) 微球的黏附过程, 主要包括 1) 微球的定位, 2) 透镜的下压, 3) 微球的黏附, 4) 位移台的下移

Fig. 4. (a) Physical image of the super-resolution microsphere objective; (b) Fabrication of the super-resolution microsphere objective lens. It mainly includes 1) sleeves, 2) coating of PDMS, 3) adhesion of microspheres, 4) integrated objective lens; (c) Physical image of side-view imaging and position feedback system; (d) Adhesion of microspheres. It mainly includes 1) positioning of microspheres, 2) downward of the lens, 3) adhesion of microspheres, 4) downward of the displacement table.

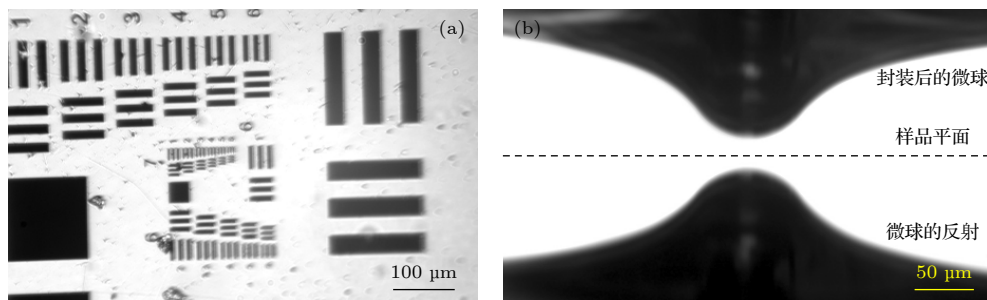


图 5 (a) 侧视成像反馈系统的标定; (b) 标定后的侧视成像反馈系统可以对微球的工作距离进行实时测量, 此时微球工作距离为 12.65  $\mu\text{m}$

Fig. 5. (a) Calibration of side-view imaging feedback system; (b) An example of microsphere lens working at a distance of 12.65  $\mu\text{m}$ .

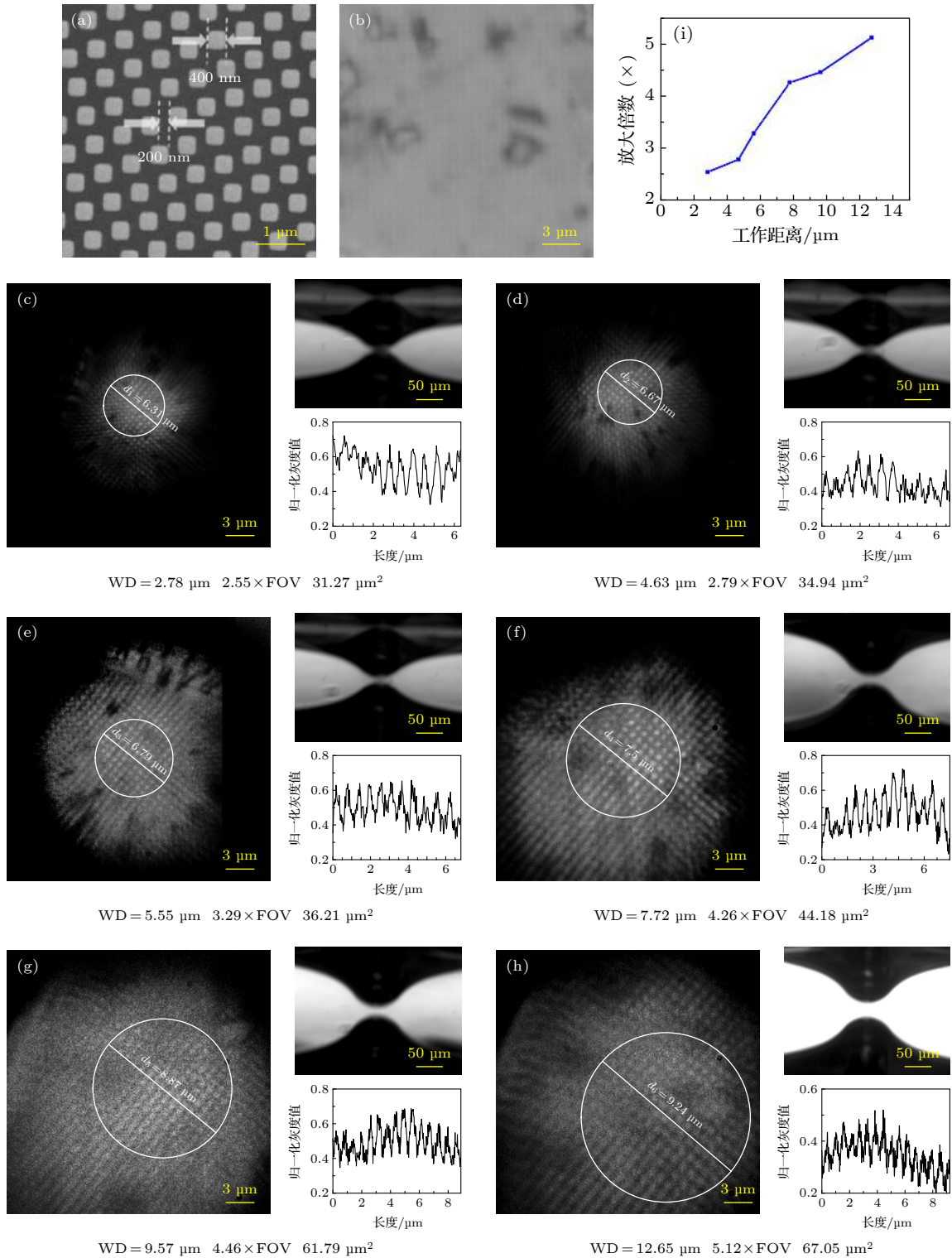


图 6 (a) 扫描电子显微镜 (SEM) 观测到的 CPU 点阵结构; (b) 不使用微球时的观察效果; (c)–(h) 使用直径 100 μm 微球分别在工作距离 2.78, 4.63, 5.55, 7.72, 9.57 和 12.65 μm 处观察到的点阵效果, 每组图的左侧为显微图像, 其中白色圆圈内是视场范围, 直径 (白色线段) 处的灰度值变化曲线如右下角所示, 右上角是相应的侧视图。它们都可以有效分辨出 200 nm 的点阵特征; (i) 微球放大倍数与工作距离的关系曲线

Fig. 6. (a) The CPU lattice structure, 400 nm blocks and 200 nm intervals, observed by scanning electron microscope (SEM); (b) the observation without microsphere lens; (c)–(h) the lattice observed at the working distance of 2.78, 4.63, 5.55, 7.72, 9.57 and 12.65 μm, respectively, with 100 μm diameter microspheres. The left side of each group of images is the microscopic image, in which the field of view is inside the white circle, the gray value change curve at the diameter (the white line) is shown in the lower right corner, and the upper right corner is the corresponding side-view images. All of them can effectively distinguish 200 nm lattice features; (i) the relationship curve between the magnification factor and the working distance of the microsphere.

其中,在黏附和操控微球之前,需要对侧视成像反馈系统进行标定,对 USAF1951 分辨率板进行成像,所采用的相机单像素尺寸为  $5.86\ \mu\text{m} \times 5.86\ \mu\text{m}$ ,该系统最高可以分辨的线对为 (group 7, element 6),标定结果如图 5(a) 所示,对应到相机靶面上的图像分辨率约  $0.41\ \mu\text{m}/\text{pixel}$ .同时,使用侧视成像反馈系统对微球的工作距离进行测量,如图 5(b) 所示,图中下部分的微球是由上方的封装微球通过样品反射形成的倒影,两球间距的一半即为工作距离,此时微球的工作距离为  $12.65\ \mu\text{m}$ .通过标定,可以利用该侧视成像系统对微球与样品之间的距离进行实时测量,控制微球超分辨系统工作距离,并防止微球碰触样品造成的样品损伤.

#### 4 实验与结果分析

为了验证一体化微球物镜的成像效果,探究微球工作距离对放大倍数和成像对比度的影响,实验选用 CPU 芯片上的微小点阵列作为观测对象.实验之前需要对 CPU 芯片进行清洗,放入丙酮中超声波震荡 3 min,然后使用酒精冲洗,最后在加热台上烘干.

实验结果如图 6 所示,图 6(a) 为扫描电子显微镜 (SEM) 观测到的芯片内部的点阵列特征,该点阵列中特征点长宽为  $400\ \text{nm}$ ,间距为  $200\ \text{nm}$ ,图 6(b) 是不使用微球,只通过物镜对芯片进行观察得到的结果,该图像无法分辨规则的点阵列结构.图 6(c)—图 6(h) 是使用微球在不同的工作距离上观测到的一系列图像,在成像过程中,一直用侧视成像系统对微球与样品之间的距离进行监测,从而测量不同工作距离下的系统放大倍数以及视场范围.如图 6(c)—图 6(h) 所示,每幅图的左侧是微球在不同工作距离下的显微成像图,右上角是侧视成像系统监测到的相应的微球工作距离,显微成像图中的白色圆圈内即为成像视场,圆圈直径 (白色直线) 处的灰度变化情况如右下角的归一化灰度值曲线所示,在成像视场内可以清晰观测到  $200\ \text{nm}$  的芯片特征,视场之外虽然也有被照亮的区域,但是由于微球球差等因素的影响已无法清晰成像.图 6(i) 是一体化物镜放大倍率随工作距离的变化曲线,放大倍数随着工作距离的增加而增大.可以发现,工作距离在  $2.78\text{--}12.65\ \mu\text{m}$  之间时,通过使用封装直径  $100\ \mu\text{m}$  微球的一体化物镜,都可以在一定视场范围内清晰分辨出  $200\ \text{nm}$  的芯片

特征,与仿真结果相符.此外,经过实际测量,在工作距离  $2.78, 4.63, 5.55, 7.72, 9.57$  和  $12.65\ \mu\text{m}$  处,通过微球可以分别实现  $2.55\times, 2.79\times, 3.29\times, 4.26\times, 4.46\times$  和  $5.12\times$  的放大倍数,视场范围 (FOV) 分别可以达到  $31.27, 34.94, 36.21, 44.18, 61.79$  和  $67.05\ \mu\text{m}^2$ .总之,随着微球工作距离的增加,系统放大倍数逐渐增大,成像视场不断增加,但是图像对比度不断下降.

为进一步量化该成像系统的超分辨成像能力,选用具有周期性条纹 (周期为  $300\ \text{nm}$ ,由  $200\ \text{nm}$  的线宽和  $100\ \text{nm}$  的沟槽组成) 的蓝光光盘作为观测样品,观测之前需要将光盘外层的保护膜去掉,将条纹结构直接暴露在空气中.

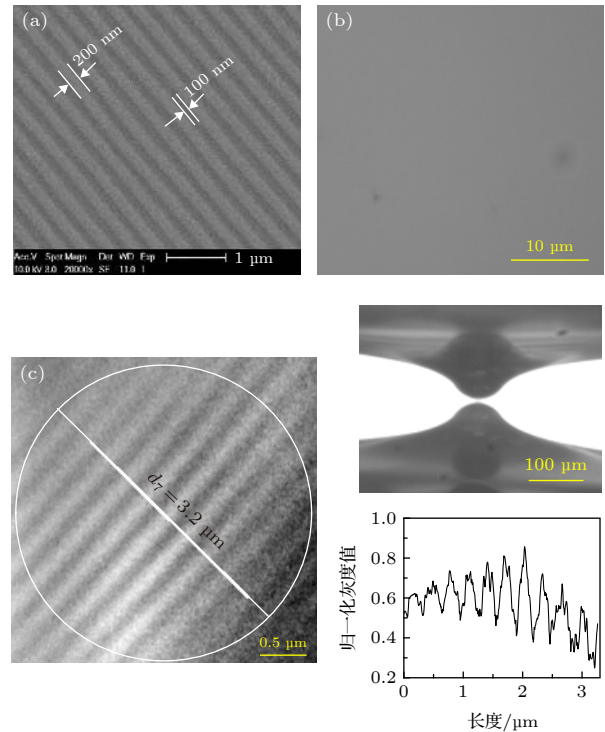


图 7 (a) 扫描电子显微镜 (SEM) 观测到的蓝光光盘条纹; (b) 不使用微球时的观察效果; (c) 使用微球时的观察效果.左侧为显微图像,可以清晰地观察到蓝光光盘条纹,其中白色圆圈内是视场范围,直径 (白色线段) 处的灰度值变化曲线如右下角所示,右上角是相应的侧视图.此时的工作距离约为  $3\ \mu\text{m}$ ,视场范围约  $8.04\ \mu\text{m}^2$

Fig. 7. (a) The BD-ROM fringe observed by scanning electron microscope (SEM); (b) the observation without microsphere lens; (c) the observation with microsphere lens. The left side of image is the microscopic image, the BD-ROM fringe can be observed clearly, in which the field of view is inside the white circle, the gray value change curve at the diameter (the white line) is shown in the lower right corner, and the upper right corner is the corresponding side-view images. The working distance is about  $3\ \mu\text{m}$  and the field of view is about  $8.04\ \mu\text{m}^2$ .

观测结果如图 7 所示, 图 7(a) 是扫描电子显微镜 (SEM) 观测的蓝光光盘条纹图像. 图 7(b) 是在该成像系统下, 不使用微球对蓝光光盘进行观察的图像, 无法看到光盘上的条纹. 图 7(c) 是在该成像系统下, 使用封装直径 100  $\mu\text{m}$  微球的一体化物镜观测的图像, 左侧是显微成像图, 可以清晰看到规则的蓝光条纹, 其中白色圆圈内是视场范围, 约 8.04  $\mu\text{m}^2$ , 圆圈外虽然也被照亮, 但是条纹特征逐渐消失, 直径 (白色线段) 处的灰度值变化情况如右下角灰度值归一化曲线所示, 可以明显分辨出与光盘周期性一致的条纹特征. 图片背景从左上至右下发生灰度值渐变, 是由于使用孔径光阑和视场光阑进行了斜照调节, 通过调节可以有效提高图像对比度. 右上角为相应的侧视成像图, 此时工作距离约为 3  $\mu\text{m}$ . 在实验中, 随着工作距离的不断增大, 图像对比度不断降低, 超分辨效果逐渐消失.

## 5 结 论

本文设计了一种基于一体化微球物镜的超分辨成像系统, 将微球与物镜整合一体, 结合侧视成像反馈系统对微球物镜的成像参数进行精准调节, 实现了可控区域的超分辨成像. 通过理论仿真和实验验证, 使用波长 470 nm 光源进行照明, 该系统可以在小于 12.65  $\mu\text{m}$  的工作距离范围内观测到 200 nm 的样品特征, 随着工作距离减小, 放大倍数逐渐降低, 图像对比度增加, 系统分辨能力增强, 当工作距离小于 3  $\mu\text{m}$  时, 该系统可以观测到 100 nm 的样品特征. 该设计结构简单, 操作方便, 可以搭配传统的明场显微镜使用, 极大提高了物镜成像性能, 具有广泛的使用价值.

## 参考文献

- [1] Rust M J, Bates M, Zhuang X W 2006 *Nat. Methods* **3** 793
- [2] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenyeh S, Bonifadno J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F 2006 *Science* **313** 1642
- [3] Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D 2006 *Biophys. J.* **91** 4258
- [4] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell S W 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** 8206
- [5] Gustafsson M G L 2000 *J. Microsc. Oxford* **198** 82
- [6] Gustafsson M G L, Webb W W 2005 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** 13081
- [7] Wang Z B, Guo W, Li L, Luk'yanchuk B, Khan A, Liu Z, Chen Z C, Hong M H 2011 *Nat. Commun.* **2** 218
- [8] Wang Z B, Li L 2011 *Laser Focus World* **7** 61
- [9] O'Brien P, Thomas P J 2016 *Nanoscience* (Vol. 3) (London: Royal Society of Chemistry) p193
- [10] Li L, Guo W, Yan Y Z, Lee S, Wang T 2013 *Light Sci. Appl.* **2** e104
- [11] Hao X, Kuang C F, Liu X, Zhang H J, Li Y H 2011 *Appl. Phys. Lett.* **99** 203102
- [12] Hao X, Kuang C F, Li Y H, Liu X, Ku Y L, Jiang Y S 2012 *Opt. Commun.* **285** 4130
- [13] Darafsheh A, Walsh G F, Negro L D, Astratov V N 2012 *Appl. Phys. Lett.* **101** 141128
- [14] Darafsheh A, Limberopoulos N I, Derov J S, Walker Jr D E, Durska M, Krizhanovskii D N, Whittaker D M, Astratov V N 2013 *Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications X* San Francisco, United States of America, February 6–7, 2013 p85940C
- [15] Darafsheh A, Limberopoulos N I, Derov J S, Walker Jr D E, Astratov V N 2014 *Appl. Phys. Lett.* **104** 061117
- [16] Darafsheh A, Guardiola C, Nihalani D, Lee D, Finlay J C, Cárabe A 2015 *Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications XII* San Francisco, United States of America, February 7–12, 2015 p933705
- [17] Darafsheh A, Guardiola C, Palovcak A, Finlay J C, Cárabe A 2015 *Opt. Lett.* **40** 5
- [18] Krivitsky L A, Wang J J, Wang Z B, Luk'yanchuk B 2013 *Sci. Rep.* **3** 3501
- [19] Wang S Y, Zhang H J, Zhang D X 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 034207 (in Chinese) [王淑莹, 章海军, 张冬仙 2013 物理学报 **62** 034207]
- [20] Wang S Y, Zhang D X, Zhang H J, Han X, Xu R 2015 *Microsc. Res. Tech.* **78** 1128
- [21] Wang S Y 2017 *Ph. D. Dissertation* (Hangzhou: Zhejiang University) (in Chinese) [王淑莹 2017 博士学位论文 (杭州: 浙江大学)]
- [22] Wang F F, Liu L Q, Yu H B, Wen Y D, Yu P, Liu Z, Wang Y C, Li W J 2016 *Nat. Commun.* **7** 13748
- [23] Chen T, Meng K, Yang Z, Liu H C, Sun L N 2018 *Opt. Precis. Eng.* **26** 1106 (in Chinese) [陈涛, 孟凯, 杨湛, 刘会聪, 孙立宁 2018 光学精密工程 **26** 1106]
- [24] Yan B, Wang Z B, Parker A L, Lai Y K, Thomas P J, Yue L, Monks J N 2017 *Appl. Opt.* **56** 3142
- [25] Chen L W, Zhou Y, Wu M X, Hong M H 2018 *OEA* **1** 17000101
- [26] Phaos Technology Beyond Optical Limit, Hong M H <http://phaos.com.sg/index.php/our-innovation/> [2020-4-3]
- [27] Lee S, Li L, Wang Z B, Guo W, Yan Y Z, Wang T 2013 *Appl. Opt.* **52** 7265
- [28] Lee S, Li L, Wang Z B 2014 *J. Opt.-U.K.* **16** 015704
- [29] Wang J G, Yang S L, Ye Y H 2018 *Acta Phys. Sin.* **67** 214209 (in Chinese) [王建国, 杨松林, 叶永红 2018 物理学报 **67** 214209]



# Super-resolution imaging system based on integrated microsphere objective lens\*

Song Yang<sup>1)2)</sup> Yang Xi-Bin<sup>2)†</sup> Yan Bing<sup>2)</sup> Wang Chi<sup>1)</sup>  
Sun Jian-Mei<sup>1)</sup> Xiong Da-Xi<sup>2)</sup>

1) (*School of Mechatronic Engineering and Automation, Shanghai University, Shanghai 200444, China*)

2) (*Research Center of Light for Health, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,*

*Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China*)

( Received 30 December 2019; revised manuscript received 14 April 2020 )

## Abstract

White-light super-resolution imaging, proposed in 2011, has been achieved by combining the transparent microspheres of the micron scale with an ordinary optical microscope. At present, in most of the researches employed is the way of spreading microspheres directly onto the surface of sample, which causes the randomness and discontinuity of microspheres. It is impossible to achieve the complete imaging of specific regions, which greatly limits the application scope of this technology. Such an issue can be solved by using microprobes or micro-cantilevers to precisely transfer the location of microsphere, but for doing so, a sophisticated controlling system is required, which is costly and not user-friendly. In this paper, a robust, controllable, easy-to-use integrated design which can efficiently consolidate microsphere and objective together is demonstrated for super-resolution imaging. The PDMS and customized metal sleeve are used to encapsulate the microsphere semi-submerged on the ordinary objective lens to achieve an integrated design. In this system, the distances among the microsphere, objective lens and the sample are controlled accurately by building a side-view imaging and position feedback system. With the help of a universal microscopic imaging system, the super-resolution imaging of specific controlled areas is realized. Based on theoretical analysis, the semi-submerged structure of the 100- $\mu\text{m}$ -diameter  $\text{BaTiO}_3$  microsphere has a strong focusing effect, which can form the so-called ‘photonic nanojet’ on a micro-scale in length and on a sub-diffraction scale in waist to possess the ability to break through the diffraction limit within the range of focal length. At the same time, experiments are carried out for investigating imaging performances at various working distances in the air. According to the experimental results, the system can clearly distinguish between the CPU lattice features of 200 nm and the Blu-ray disc fringe of 100 nm, which means that the resolution of the ordinary microscopic objective lens (40 $\times$ , NA 0.6) is significantly enhanced by 4.78 $\times$ . In addition, with the increase of working distance, the magnification factor increases gradually, but the image contrast becomes worse, and the super-resolution effect fades. The integrated design which can match with ordinary optical microscope to achieve super resolution imaging has universality of installation and operation, and greatly conduces to super-resolution imaging of sub-diffraction limit samples.

**Keywords:** microsphere super-resolution imaging, integrated objective, side-view imaging feedback system

**PACS:** 42.15.Eq, 42.30.Va, 42.70.Mp, 42.79.Bh

**DOI:** 10.7498/aps.69.20191994

\* Project supported by the National Basic Research Program of China (Grant Nos. 2017YFC0109900, 2018YFC0114800), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61405238), and the Key R&D Program of Jiangsu Province, China (Grant No. BE2018666).

† Corresponding author. E-mail: [yangxb@sibet.ac.cn](mailto:yangxb@sibet.ac.cn)