(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2014 年 5 月 22 日 (22.05.2014)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/075448 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/078029

(22) 国际申请日: 2013 年 6 月 26 日 (26.06.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201210467807.7 2012 年 11 月 19 日 (19.11.2012) CN

(71) 申请人: **深圳大学** (SHENZHEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(72) 发明人: **牛憨笨** (NIU, Hanben); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 **于斌** (YU, Bin); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 **陈丹妮** (CHEN, Danni); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 **李恒** (LI, Heng); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(74) 代理人: **深圳中一专利商标事务所** (SHENZHEN ZHONGYI PATENT AND TRADEMARK OFFICE); 中国广东省深圳市福田区深南中路 1014 号老特区报社四楼西区（5 号信箱）, Guangdong 518028 (CN)。

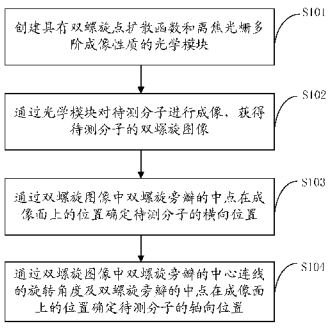
(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

[见续页]

(54) **Title**: METHOD, OPTICAL COMPONENT AND SYSTEM FOR EXTENDED DEPTH-OF-FIELD THREE-DIMENSIONAL NANOSCALE-RESOLUTION IMAGING

(54) **发明名称**: 大景深三维纳米分辨成像方法、光学组件及成像系统



S101 BUILD AN OPTICAL COMPONENT HAVING A DOUBLE-HELIX POINT SPREAD FUNCTION AND DEFOCUSING GRATING MULTISTAGE IMAGING PROPERTIES
S102 PERFORM IMAGING OF A MOLECULE TO BE DETECTED BY THE OPTICAL COMPONENT TO OBTAIN A DOUBLE-HELIX IMAGE OF THE MOLECULE TO BE DETECTED
S103 DETERMINE A HORIZONTAL POSITION OF THE MOLECULE TO BE DETECTED ACCORDING TO POSITIONS, ON THE IMAGING PLANE, OF MIDDLE POINTS OF DOUBLE-HELIX SIDELOBES IN THE DOUBLE-HELIX IMAGE
S104 DETERMINE AN AXIAL POSITION OF THE MOLECULE TO BE DETECTED ACCORDING TO A ROTATION ANGLE OF A CONNECTION LINE OF CENTERS OF THE DOUBLE-HELIX SIDELOBES IN THE DOUBLE-HELIX IMAGE, AND THE POSITIONS, ON THE IMAGING PLANE, OF THE MIDDLE POINTS OF THE DOUBLE-HELIX SIDELOBES

图 1 / FIG. 1

(57) **Abstract**: A method for extended depth-of-field three-dimensional nanoscale-resolution imaging, which is applicable to the technical field of microscopic imaging, comprises the following steps: building an optical component having a double-helix point spread function and defocusing grating multistage imaging properties; performing imaging of a molecule to be detected by the optical component to obtain a double-helix image; determining a horizontal position of the molecule to be detected according to positions of middle points of double-helix sidelobes in the double-helix image; and determining an axial position of the molecule to be detected according to a rotation angle of a connection line of centers of the double-helix sidelobes in the double-helix image, and the positions of the middle points of the double-helix sidelobes. By combining the double effects of the double-helix point spread function and the defocusing grating multistage imaging, the method extends the depth of field and improves the resolution ratio. The method can be used for dynamic range imaging of subcellular fractions having any depth values in a whole cell, can produce dynamic function images of multiple moving molecules, and is of great significance to high-level understanding of the rule and relationship between subcellular structures and changes in cell function.

(57) **摘要**:

[见续页]

WO 2014/075448 A1

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种大景深三维纳米分辨成像方法，其适用于显微成像技术领域，包括下述步骤：创建具有双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质的光学模块；通过光学模块对待测分子进行成像，获得双螺旋图像；通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中点的位置确定待测分子的横向位置；通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中心连线的旋转角度及双螺旋旁瓣的中点位置确定待测分子的轴向位置。该方法将双螺旋点扩散函数及离焦光栅多阶成像的双重效应相结合，既扩大了景深，又提高了分辨率，该方法可用于完整细胞内任意深度亚细胞的动态范围成像，可获得多个运动分子的动态功能图像，对于在更高水平上认识亚细胞结构与细胞功能变化的关系和规律具有重要意义。

大景深三维纳米分辨成像方法、光学组件及成像系统

技术领域

本发明属于显微成像技术领域，特别涉及一种大景深三维纳米分辨成像方法、光学组件及成像系统。

背景技术

细胞是生物体及生命活动的基本单元，对细胞的深入研究是揭开生命奥秘，改造生命和征服疾病的关键。在完整细胞下进行分子成像，进而获取亚细胞精细结构甚至分子图谱，并能在活体细胞下获取这些结构变化及分子动态过程的信息一直是细胞学研究的重要方向。同时，对完整细胞进行纳米分辨三维结构和功能成像，在更高水平上认识亚细胞结构与细胞功能变化的关系和规律，是生命科学的迫切需求，也是对成像科学的重大挑战。

近年来，远场纳米分辨荧光显微成像技术取得了较大的发展。目前最为突出的方法有两种，一种是基于缩小有效激发光斑，通过直接减小点扩展函数的半高宽来提高分辨率，包括 STED，GSD 等；另一种则是基于单分子定位技术，包括 STORM，PALM 等。前者是通过受激态或基态耗尽的方式，压缩荧光有效发射区域；后者则是利用荧光标记本身的开关效应，通过稀疏激发、分时成像、质心定位以及图像合成来实现纳米分辨成像，已经实现 20nm 的横向空间分辨率。

然而，利用单分子定位技术对直径为 10μm 以上的细胞进行纳米分辨三维成像仍然存在很多问题。首先，单分子定位对于轴向分辨率并没有提高，常常需要结合某些改进轴向分辨率的方法，如柱面镜像散法、双螺旋点扩散函数法（DH-PSF）、双层平面探测法、虚拟空间超分辨显微术（VVSRM）等，可实现

横向空间分辨率达 20-30nm 左右，轴向分辨率达 40-70nm 的三维成像，目前，这些方法的成像深度只有 2μm。另外，干涉光敏定位显微技术（iPALM)可将三维的分辨率提高到 20nm 以内，但成像范围仅被限制在盖玻片以下 500nm 的深度范围内，因此，这些方法的成像深度均较小。

细胞内动态成像要实现细胞内同时追踪多个分子，这要求成像手段在三维空间以纳米定位精度快速探测十几微米景深范围内的多个目标分子。目前的单分子追踪(SPT)方法，既可以对样品中只包含目标分子的区域进行局部探测，实现 1nm 精度的荧光成像（FIONA）；也可以采用宽场成像的方法，实现同时追踪多个分子。虽然宽场探测的 SPT 方法已经发展了图像堆栈、离焦成像、用聚焦激光光束环绕粒子运动、Fresnel 粒子追踪(FPT)，以及柱面镜像散等多种轴向分辨的方法，已经可以实现三维的纳米定位，但目前实现的成像深度仅仅为 3μm 左右，而一般完整细胞的厚度有十几微米，因此，现有的方法仍不能满足细胞内多分子追踪的大景深要求。

发明内容

本发明的目的在于提供一种大景深三维纳米分辨成像方法，旨在解决传统方法成像深度小，难以满足分子定位的大景深要求的问题。

本发明是这样实现的，一种大景深三维纳米分辨成像方法，包括下述步骤：

创建具有双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质的光学模块；

通过所述光学模块对待测分子进行成像，获得待测分子的双螺旋图像；

通过所述双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定待测分子的横向位置；

通过所述双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中心连线的旋转角度及所述双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定待测分子的轴向位置。

本发明的另一目的在于提供一种用于大景深三维纳米分辨成像的光学组件，包括沿光路传输方向依次设置的：

第一透镜，用于将待测分子发出的荧光进行准直；

光学模块，具有双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质，用于将所述荧光转换为具有双螺旋及多阶成像性质的成像光束；

第二透镜，用于将所述成像光束输出以用于成像。

本发明的又一目的在于提供一种大景深超分辨荧光显微成像探测系统，包括沿光路传输方向依次设置的：

探测物镜，用于接收含有待测分子发出的荧光的光束；

滤光片，用于对所述光束进行滤波并输出所述荧光；

双色镜，用于对所述荧光进行反射；

管镜，用于将反射的荧光聚焦并向成像组件输出；

成像组件，采用上述的光学组件，用于将所述荧光转换为具有双螺旋及多阶成像性质的成像光束；

探测器，用于接收所述成像光束并进行双螺旋及多阶成像。

本发明创建了综合双螺旋点扩散函数及离焦光栅多阶成像双重效应的光学模块，多阶成像的景深较大，双螺旋成像的分辨率较高且具有一定的景深，通过上述光学模块成像时，一方面通过多阶成像和双螺旋成像大幅度扩大了景深，另一方面通过双螺旋成像显著的提高了分辨率，本发明的成像景深可达十几微米，既可用于完整细胞内任意深度亚细胞的动态范围成像，又可获得多个运动分子的动态功能图像，对于在更高水平上认识亚细胞结构与细胞功能变化的关系和规律具有重要意义。

附图说明

图 1 是本发明第一实施例提供的大景深三维纳米分辨成像方法的流程图；

图 2 是不同深度的双螺旋点扩散函数和标准点扩散函数成像的对照图；

图 3 是双螺旋点扩散函数成像的强度与相位分布；

图 4 是双螺旋点扩散函数在不同轴向位置处的成像图形；

图 5 是双螺旋图像两个旁瓣中心连线的旋转角度与 Z 轴位置的关系曲线图;

图 6 是离焦光栅成像原理示意图;

图 7 是本发明第一实施例提供的相位片的示意图;

图 8 是利用图 7 所示相位片进行成像的效果图;

图 9 是本发明第二实施例提供的用于大景深三维纳米分辨成像的光学组件示意图;

图 10 是本发明第三实施例提供的一种大景深超分辨荧光显微成像探测系统示意图;

图 11 是本发明第三实施例提供的另一种大景深超分辨荧光显微成像探测系统示意图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

以下结合具体实施例对本发明的具体实现进行更加详细的描述:

实施例一:

图 1 示出了本发明第一实施例提供的大景深三维纳米分辨成像方法的流程图，为了便于说明，仅示出了与本实施例相关的部分。

参考附图 1，该方法主要包括下述步骤:

在步骤 S101 中，创建具有双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质的光学模块;

在步骤 S102 中，通过光学模块对待测分子进行成像，获得待测分子的双螺旋图像;

在步骤 S103 中，通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确

定待测分子的横向位置;

在步骤 S104 中,通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中心连线的旋转角度及双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定待测分子的轴向位置。

通过双螺旋点扩散函数(DH-PSF)实现三维纳米定位是基于一种被称为自成像的现象。DH-PSF 是一种三维光学响应,具有随离焦量不断旋转的圆形不对称横截面轮廓,如图 2 所示。双螺旋点扩散函数主要通过位于拉盖尔-高斯(Laguerre- Gauss ,简记为 LG)模式平面上特定直线上的 LG 光束模式的线性叠加构成带有旋转和缩放的自成像光束,然后将自成像光束的一个横截面中的复合场作为光学模块的光学传递函数,那么,光学模块的传递函数就是双螺旋点扩散函数。该拉盖尔-高斯光束模式为:

$$u_{n,m}(r)=G(\hat{\rho},\hat{z})R_{n,m}(\hat{\rho})\Phi_m(\phi)Z_n(\hat{z}) \quad (1)$$

其中, $r=(\rho,\phi,z)$ 为空间点的柱坐标,

$\hat{\rho}=\rho/\omega(\hat{z})$ 为高斯光斑的径向坐标, $\omega(\hat{z})=\omega_0\left[1+\hat{z}^2\right]^{1/2}$, ω_0 为束腰半径,

$\hat{z}=z/z_0$ 为纵向坐标, $z_0=\pi\omega_0^2/\lambda$ 为瑞利长度,

$u_{n,m}(r)$ 的组成为:

$$G(\hat{\rho},\hat{z})=\frac{\omega_0}{\omega(\hat{z})}\exp(-\hat{\rho}^2)\exp(i\hat{\rho}^2\hat{z})\exp\left[-i\psi(\hat{z})\right] \quad (2)$$

$$R_{n,m}(\hat{\rho})=\left(\sqrt{2}\hat{\rho}\right)^{|m|}L^{|m|}_{(n-|m|)/2}(2\hat{\rho}^2) \quad (3)$$

$$\Phi_m(\phi)=\exp(im\phi) \quad (4)$$

$$Z_n(\hat{z})=\exp\left[-in\psi(\hat{z})\right] \quad (5)$$

其中, $\psi(\hat{z})=\arctan(\hat{z})$ 为古伊相位, $L^{|m|}_{(n-|m|)/2}$ 为广义的拉盖尔多项式, n,m 为整数,且 $n=|m|,|m|+2,|m|+4,|m|+6,....$,

当 n,m 取下列五组数值:(1,1),(3,5),(5,9),(7,13),

（9，17），可获得五种拉盖尔-高斯光束模式。将这五种拉盖尔-高斯光束模式进行等权重叠加，可形成带有旋转和缩放的自成像光束，即形成一个新的光场分布函数—双螺旋旋转光束，如图 3。基于 LG 函数的傅立叶变换不变特性,该函数如作为光学传递函数应用到光学系统中,光学系统的点扩散函数将变为双螺旋点扩散函数,且双螺旋旁瓣随离焦量变化而旋转的速度与 LG 模式平面上所选取的直线斜率成正比,在聚焦区速度最大，如图 4。

一个 DH-PSF 系统就是在标准成像系统的傅里叶平面加入一个特殊设计的光学模块，此光学模块使其透射率函数在傅里叶变化的聚焦区形成双螺旋的形式，步骤 S101 中所创建的光学模块即具有该特性，通过该光学模块所成的像是两个围绕着光轴旋转的旁瓣，其中一个绕着光轴顺时针旋转，而另一个则逆时针旋转。用 DH-PSF 进行三维纳米定位时，分子的横向定位点通过两个旁瓣的中点来估计， 而其轴向位置则根据两个旁瓣中心连线的旋转角度确定，且定位精度极高，具体可参考图 5 所示的 DH-PSF 两个旁瓣中心连线的旋转角度与 Z 轴位置的关系曲线。

另一方面，该光学模块还具有离焦光栅的多阶成像性质，离焦光栅实质上是一个离轴的二元相位菲涅耳波带片，一方面，它具有普通光栅的分光作用，将入射光在光栅的不同衍射级上分束；另一方面，它具有菲涅耳波带片的透镜作用，在不用的衍射级上引入不同的透镜效应。该光栅与短焦距透镜密接使用时，短焦距透镜提供主要的聚焦能力，在±1 级衍射光轴上，离焦光栅对透镜聚焦能力进行微调，使得±1 级衍射光有不同的焦距，分别稍短于和稍长于透镜焦距。短焦距透镜的焦平面在±1 级衍射光上的截面是前后对称的离焦面，因此离焦光栅能够使同一个物体成像在不同的像平面。同时可以使位于不同物平面上的物点成像在同一像平面。如图 6 所示，位于不同物面的 A、B、C 三点的物可以在像方同一个像平面上的 A’、B’、C’处成像，根据 A’、B’、C’之间的间距 Δd 可确定 A、B、C 三点的轴向相对距离 Δz，离焦光栅的景深较大，可达十几微米，几乎与完整细胞的大小相应。

离焦光栅的相位函数为:

$$\Phi_m(X,Y)=\frac{2\pi m\Delta_X(X,Y)}{d}$$

（6）

其中，

$$\Delta_X(X,Y)=\frac{W_{20}d}{\lambda R^2}(x^2+y^2) \quad (7)$$

$$\Phi_m(X,Y)=m\frac{2\pi W_{20}}{\lambda R^2}(x^2+y^2) \quad (8)$$

式中， R 为光栅半径；$W_{20}=\frac{R^2}{2mf}$，表示离焦光栅的散焦能力，是散焦的标准系数。

基于上述双螺旋成像及离焦光栅成像的性质，本实施例基于波前编码的方式，将双螺旋点扩散函数与离焦光栅相组合，形成一个新的光学模块，波前编码是用于使用一个或多个专门设计的相位掩模来创建诸如透镜之类光学模块的光学传递函数的方法。本实施例基于波前编码的方式创建的光学模块同时具有多焦面成像和双螺旋点扩散函数的功能。基于上述说明，该光学模块的相位函数可表示为:

$$\Phi_h=\Phi_{db}+\Phi_g$$

其中，Φ_{db} 为几种拉盖尔-高斯光束模式等权重叠加后形成的复振幅的相位，这几种拉盖尔-高斯光束模式具体可以是当上述的 n,m 取（1，1），（3，5），（5，9），（7，13），（9，17）时对应的五种拉盖尔-高斯光束模式。本实施例将（1,1），(3,5），(5,9），(7,13），(9,17）五种模式等权重叠加形成双螺旋旋转光束的相位形式作为初始值，然后通过优化，获得高效率的双螺旋光束纯相位分布。

另外，Φ_g 具有式（8）的形式，即：$\Phi_g=\Phi_m(X,Y)=m\frac{2\pi W_{20}}{\lambda R^2}(x^2+y^2)$

其中，R 为光栅半径；$W_{20}=\frac{R^2}{2mf}$，表示光学模块的散焦能力，是散焦的标

准系数。

进一步的，该光学模块具体可以是通过微细加工技术制作的相位片，也可以直接采用空间光调制器实现。

进一步的，待测分子的横向位置具体通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定；轴向位置则通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中心连线的旋转角度及双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定。

可以理解，在进行光学系统设计时，会预先对系统进行标定，建立双螺旋旁瓣的中心位置与待测分子的横向位置的对应关系，以及待测分子与多阶成像物平面的对应关系，并建立双螺旋旁瓣的旋转角度和离焦量的对应关系等，将这些信息预存入数据库待实际测量时调用。在实际测量时，可根据双螺旋图像中两旁瓣的中点的具体位置确定物点的横向位置，并初步确定物点位于多阶成像某物面附近，再进一步通过两旁瓣的旋转角度确定物点与该物面的距离，进而确定其轴向位置。

为了验证该方法，进行了初步的计算机模拟验证，基于上述方法设计了衍射相位片，如图 7 所示，并模拟了该成像方法。该相位片的通光直径: $D = 5mm$，像素大小: $\Delta = 15\mu m$，像素数: 336×336，波长: $\lambda = 670nm$。

将此相位版用于三维成像系统中，模拟了粒子处于不同位置处的成像，如图 8 所示。由此，可看出该方法可以实现 12 微米的成像范围。

综上所述，本实施例的光学模块综合了双螺旋成像及离焦光栅多阶成像的双重效应，多阶成像的景深较大，双螺旋成像的分辨率较高且具有一定的景深，通过该光学模块成像时，一方面，多阶成像可以大幅度扩大景深，并且在可清晰成像的物面两侧，还会由于双螺旋效应进一步扩大轴向定位的范围，进而扩大景深；另一方面，双螺旋成像的分辨率较高，在景深范围内任意物面上的物点都可通过双螺旋效应实现高分辨率的轴向定位，进而提高了三维成像的分辨率。因此，本实施例通过将双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像的性质结合

在一起来进行三维成像，即扩大了景深又提高了分辨率，其景深可达十几微米，可以用于完整细胞内任意深度亚细胞的动态范围成像，又可获得多个运动分子的动态功能图像，对于在更高水平上认识亚细胞结构与细胞功能变化的关系和规律具有重要意义。

实施例二：

图 9 示出了本发明第二实施例提供的用于大景深三维纳米分辨成像的光学组件示意图，为了便于说明，仅示出了与本实施例相关的部分。

基于上述实施例提供的大景深三维纳米分辨成像方法，本实施例进一步提供一种可用于大景深三维纳米分辨成像的光学组件。该组件主要用于三维成像系统中，以实现细胞的超大景深及高分辨率的三维成像。

该光学组件主要包括沿光路传输方向依次设置的第一透镜 901、光学模块 902 和第二透镜 903。其中，光学模块 902 具有上述的双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质，是基于上述方法设计的光学模块 902，其具有上述实施例一中所述的功能，此处不再赘述。通常，光学系统通过探测待测分子发出的荧光对分子进行定位追踪，该系统中，第一透镜 901 将待测分子发出的荧光进行准直并向光学模块 902 输出，光学模块 902 将准直后的荧光转换为具有双螺旋及多阶成像性质的成像光束，然后由第二透镜 903 输出，将成像光束聚焦于探测器 904 的像平面上，在探测器上实现双螺旋及多阶成像。通过成像面上的双螺旋旁瓣的中心在成像面上的位置可以确定待测分子的横向位置，通过双螺旋旁瓣的中心及两旁瓣之间的连线的旋转角度确定待测分子的轴向位置。

在本实施例中，光学模块 902 具体可以是通过光刻的方法制作的相位版，也可以直接采用空间光调制器，该光学模块 902 的相位函数如实施例一所述，此处不再赘述。

实施例三：

图 10 示出了本发明第三实施例提供的大景深超分辨荧光显微成像探测系统示意图，图 11 示出了本发明第三实施例提供的另一种大景深超分辨荧光显微

成像探测系统示意图，为了便于说明，仅示出了与本实施例相关的部分。

本发明实施例提供了一种基于上述成像方法和光学组件的大景深超分辨荧光显微成像探测系统，将本发明的成像方法与超分辨荧光显微成像方法（如PALM，STORM）相结合，实现超大景深三维纳米分辨荧光显微成像探测。

如图 10，该大景深超分辨荧光显微成像探测系统包括沿光路的传输方向依次设置的探测物镜 1、滤光片 2、双色镜 3、管镜 4、成像组件 5 及探测器 6。其中，成像组件 5 采用上述实施例二中的光学组件。作为一种实现方式，该光学组件 5 中的光学模块 53 具体可以是一相位片，用于将荧光转换为具有双螺旋及多阶成像性质的成像光束。

在该系统中，探测物镜 1 位于待测物的出光侧，待测物被激发光激发后可发出荧光，含有激发光和荧光及其他杂散光的光束由探测物镜 1 接收，该光束经过滤光片 2 的滤光作用后滤除激发光及杂散光，透过荧光，荧光经双色镜 3 反射至管镜 4，通过管镜 4 进行聚焦并传输至光学组件 5 的第一透镜 51，荧光光束通过相位片后转变为双螺旋及多阶成像光束，最后通过第二透镜 52 聚焦于探测器 6 的成像面上，在成像面上形成双螺旋的像点。

作为另一种实现方式，如图 11，光学模块 53 还可以采用空间光调制器来显示相位片的相位函数，实现相位片的功能。此时，该成像系统还包括位于双色镜 3 和管镜 4 之间的偏振片 7，用于将荧光光束转换为线偏振光，以适用于空间光调制器。

上述成像系统通过本发明提供的光学组件并基于本发明提供的成像方法进行双螺旋及多阶成像，利用多阶成像的大景深效应及双螺旋成像的高精度轴向定位效应，同时实现了超大景深及高分辨率的三维纳米分辨成像，可实现任意深度亚细胞的动态范围成像，又可获得多个运动分子的动态功能图像，适用于完整细胞的三维纳米分辨成像。该大景深三维纳米分辨成像系统既可以单独用于细胞成像，也可内置于细胞成像以及其它成像设备中，因此，设有该成像系统的成像设备也在本发明的保护范围内。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种大景深三维纳米分辨成像方法，其特征在于，包括下述步骤：

创建具有双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质的光学模块；

通过所述光学模块对待测分子进行成像，获得待测分子的双螺旋图像；

通过所述双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定待测分子的横向位置；

通过所述双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中心连线的旋转角度及所述双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定待测分子的轴向位置。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述光学模块的双螺旋点扩散函数通过下述方法实现：

通过位于拉盖尔-高斯模式平面上特定直线上的拉盖尔-高斯光束模式的线性叠加构成带有旋转和缩放的自成像光束；

将自成像光束的一个横截面中的复合光场作为所述光学模块的光学传递函数，使所述光学模块具有双螺旋点扩散函数。

3、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述拉盖尔-高斯光束模式为：

$u_{n,m}(r)=G(\hat{\rho},\hat{z})R_{n,m}(\hat{\rho})\Phi_m(\phi)Z_n(\hat{z})$，

其中，$r=(\rho,\phi,z)$ 为空间点的柱坐标，

$\hat{\rho}=\rho/\omega(\hat{z})$ 为高斯光斑的径向坐标，$\omega(\hat{z})=\omega_0\left[1+\hat{z}^2\right]^{1/2}$，$\omega_0$ 为束腰半径，

$\hat{z}=z/z_0$ 为纵向坐标，$z_0=\pi\omega_0^2/\lambda$ 为瑞利长度，

$u_{n,m}(r)$ 的组成为：

$$G(\hat{\rho},\hat{z})=\frac{\omega_0}{\omega(\hat{z})}\exp\left(-\hat{\rho}^2\right)\exp\left(i\hat{\rho}^2\hat{z}\right)\exp\left[-i\psi(\hat{z})\right]$$

$$R_{n,m}(\hat{\rho})=\left(\sqrt{2}\hat{\rho}\right)^{|m|}L^{|m|}_{(n-|m|)/2}\left(2\hat{\rho}^2\right)$$

$$\Phi_m(\phi)=\exp(im\phi)$$

$Z_n(\hat{z}) = \exp\left[-in\psi(\hat{z})\right]$,

其中，$\psi(\hat{z}) = \arctan(\hat{z})$ 为古伊相位，$L^{|m|}_{(n-|m|)/2}$ 为广义的拉盖尔多项式，n, m 为整数，且取下列五组数值：（1，1），（3，5），（5，9），（7，13），（9，17），获得五种拉盖尔-高斯光束模式；

所述五种拉盖尔-高斯光束模式进行等权重叠加，形成所述带有旋转和缩放的自成像光束。

4、如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述光学模块的相位函数为：

$$\Phi_h = \Phi_{db} + \Phi_g$$

其中，Φ_{db} 为所述五种拉盖尔-高斯光束模式等权重叠加后形成的复振幅的相位；

$$\Phi_g = \Phi_m(X,Y) = m\frac{2\pi W_{20}}{\lambda R^2}(x^2 + y^2)$$

其中，R 为光栅半径；$W_{20} = \frac{R^2}{2mf}$，表示光学模块的散焦能力，是散焦的标准系数。

5、如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述光学模块为采用微细加工技术制作的相位片或采用空间光调制器实现。

6、一种用于大景深三维纳米分辨成像的光学组件，其特征在于，包括沿光路传输方向依次设置的：

第一透镜，用于将待测分子发出的光束进行准直；

光学模块，具有双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质，用于将所述光束转换为具有双螺旋及多阶成像性质的成像光束；

第二透镜，用于将所述成像光束输出以用于成像。

7、如权利要求 6 所述的光学组件，其特征在于，所述光学模块的相位函数为：

$$\Phi_h = \Phi_{db} + \Phi_g$$

其中，$\Phi_g = \Phi_m(X,Y) = m\frac{2\pi W_{20}}{\lambda R^2}(x^2+y^2)$

R 为光栅半径；$W_{20} = \frac{R^2}{2mf}$，表示光学模块的散焦能力，是散焦的标准系数，

Φ_{db} 为五种拉盖尔-高斯光束模式等权重叠加后形成的复振幅的相位；

所述拉盖尔-高斯光束模式为：

$u_{n,m}(r) = G(\hat{\rho},\hat{z})R_{n,m}(\hat{\rho})\Phi_m(\phi)Z_n(\hat{z})$，

其中，$r=(\rho,\phi,z)$ 为空间点的柱坐标，$\hat{\rho}=\rho/\omega(\hat{z})$ 为高斯光斑的径向坐标，$\omega(\hat{z})=\omega_0\left[1+\hat{z}^2\right]^{1/2}$，$\omega_0$ 为束腰半径，$\hat{z}=z/z_0$ 为纵向坐标，$z_0=\pi\omega_0^2/\lambda$ 为瑞利长度，

$u_{n,m}(r)$ 的组成为：

$$G(\hat{\rho},\hat{z}) = \frac{\omega_0}{\omega(\hat{z})}\exp(-\hat{\rho}^2)\exp(i\hat{\rho}^2\hat{z})\exp\left[-i\psi(\hat{z})\right]$$

$$R_{n,m}(\hat{\rho}) = \left(\sqrt{2}\hat{\rho}\right)^{|m|}L^{|m|}_{(n-|m|)/2}(2\hat{\rho}^2)$$

$$\Phi_m(\phi) = \exp(im\phi)$$

$$Z_n(\hat{z}) = \exp\left[-in\psi(\hat{z})\right],$$

其中，$\psi(\hat{z})=\arctan(\hat{z})$ 为古伊相位，$L^{|m|}_{(n-|m|)/2}$ 为广义的拉盖尔多项式，n,m 为整数；

所述五种拉盖尔-高斯光束模式分别为当 n,m 取（1，1），（3，5），（5，9），（7，13），（9，17）时对应的模式。

8、一种大景深超分辨荧光显微成像探测系统，其特征在于，包括沿光路传输方向依次设置的：

探测物镜，用于接收含有待测分子发出的荧光的光束；

滤光片，用于对所述光束进行滤波并输出所述荧光；

双色镜，用于对所述荧光进行反射；

管镜，用于将反射的荧光聚焦并向成像组件输出；

成像组件，采用权利要求 6 或 7 所述的光学组件，用于将所述荧光转换为具有双螺旋及多阶成像性质的成像光束;

探测器，用于接收所述成像光束并进行双螺旋及多阶成像。

9、如权利要求 8 所述的系统，其特征在于，所述光学组件中的光学模块为通过微细加工技术制作的相位片。

10、如权利要求 8 所述的系统，其特征在于，所述光学组件中的光学模块为空间光调制器，所述系统还包括:

偏振片，位于所述双色镜和管镜之间，用于将所述荧光转换为适用于所述空间光调制器的线偏振光。

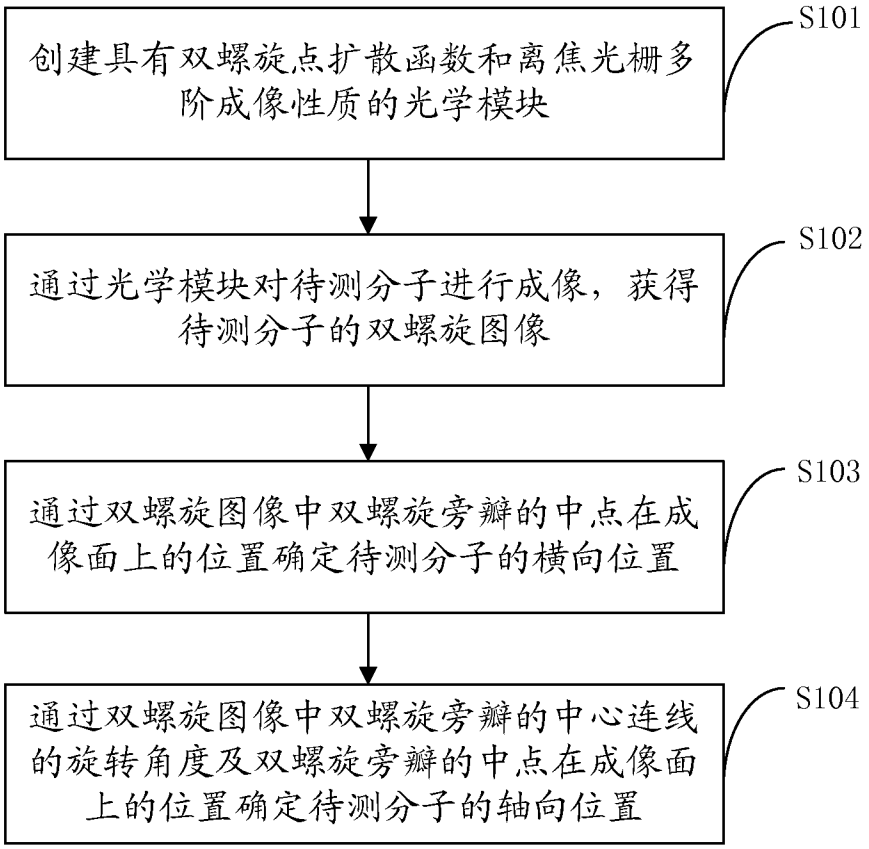

创建具有双螺旋点扩散函数和离焦光栅多阶成像性质的光学模块
S101
通过光学模块对待测分子进行成像，获得待测分子的双螺旋图像
S102
通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定待测分子的横向位置
S103
通过双螺旋图像中双螺旋旁瓣的中心连线的旋转角度及双螺旋旁瓣的中点在成像面上的位置确定待测分子的轴向位置
S104

图 1

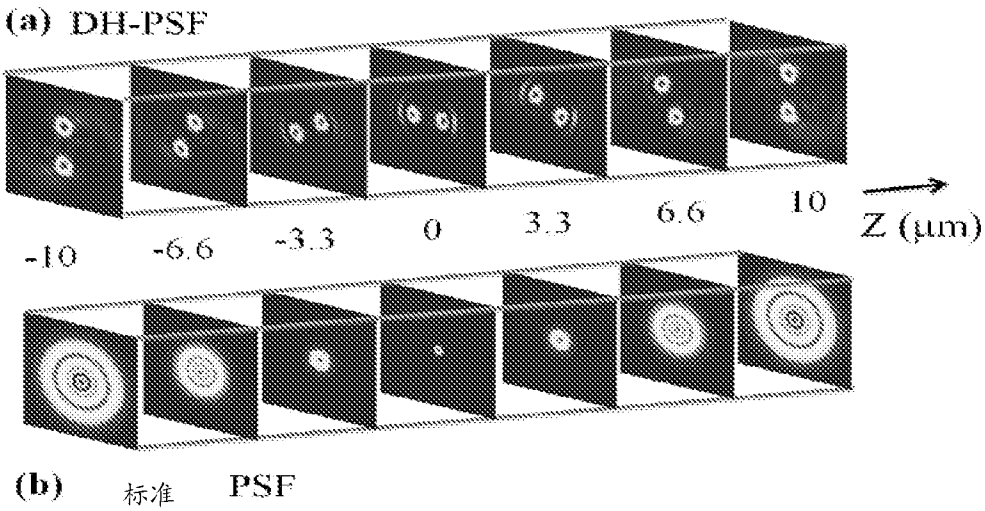

(a) DH-PSF
-10
-6.6
-3.3
0
3.3
6.6
10
Z (μm)
(b) 标准 PSF

图 2

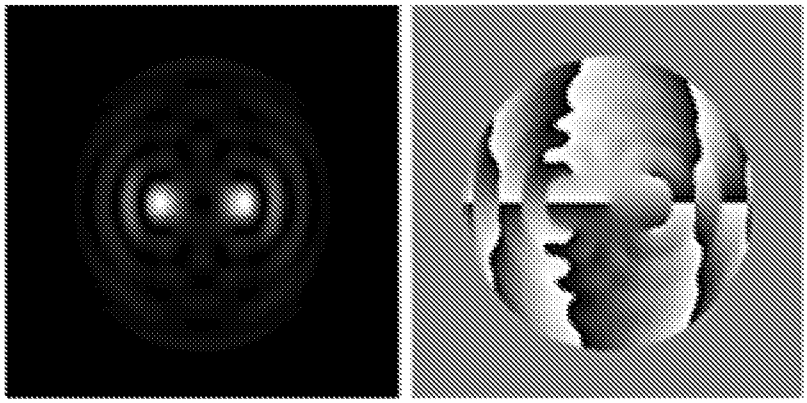


图 3

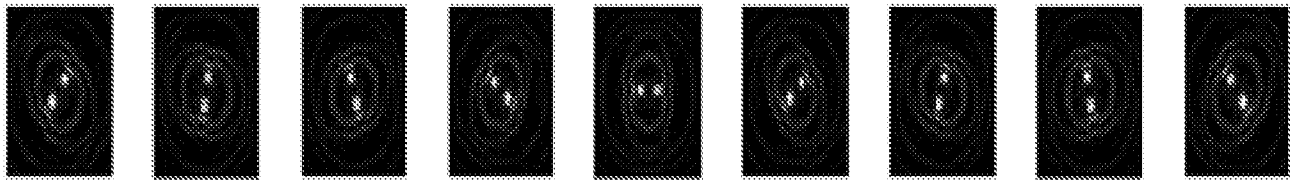


图 4

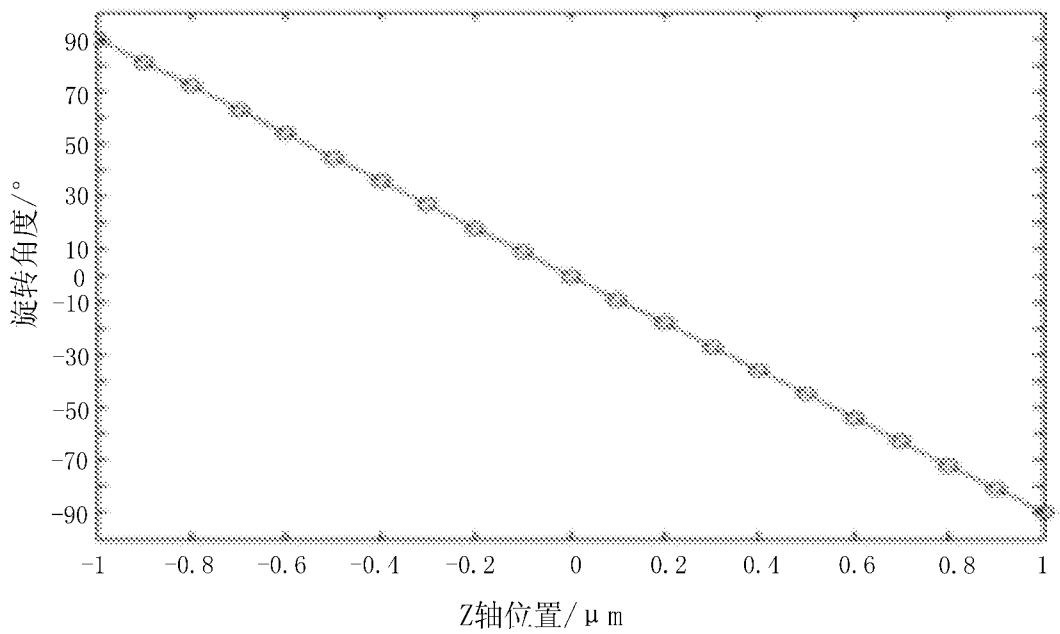

90
70
50
30
10
0
-10
-30
-50
-70
-90
旋转角度/°
-1
-0.8
-0.6
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
Z轴位置/μm

图 5

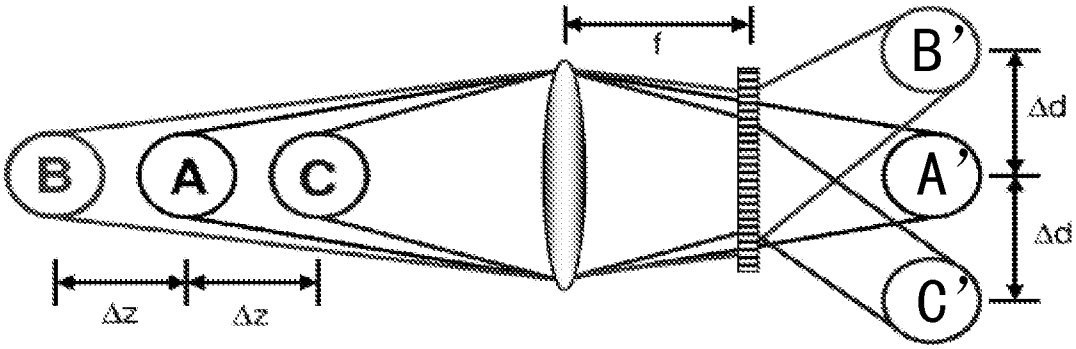


图 6

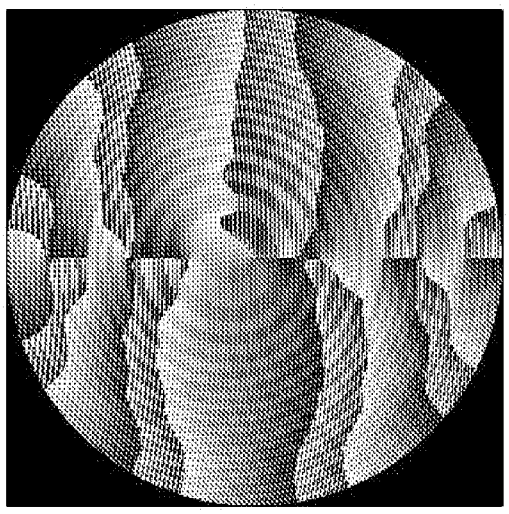


图 7

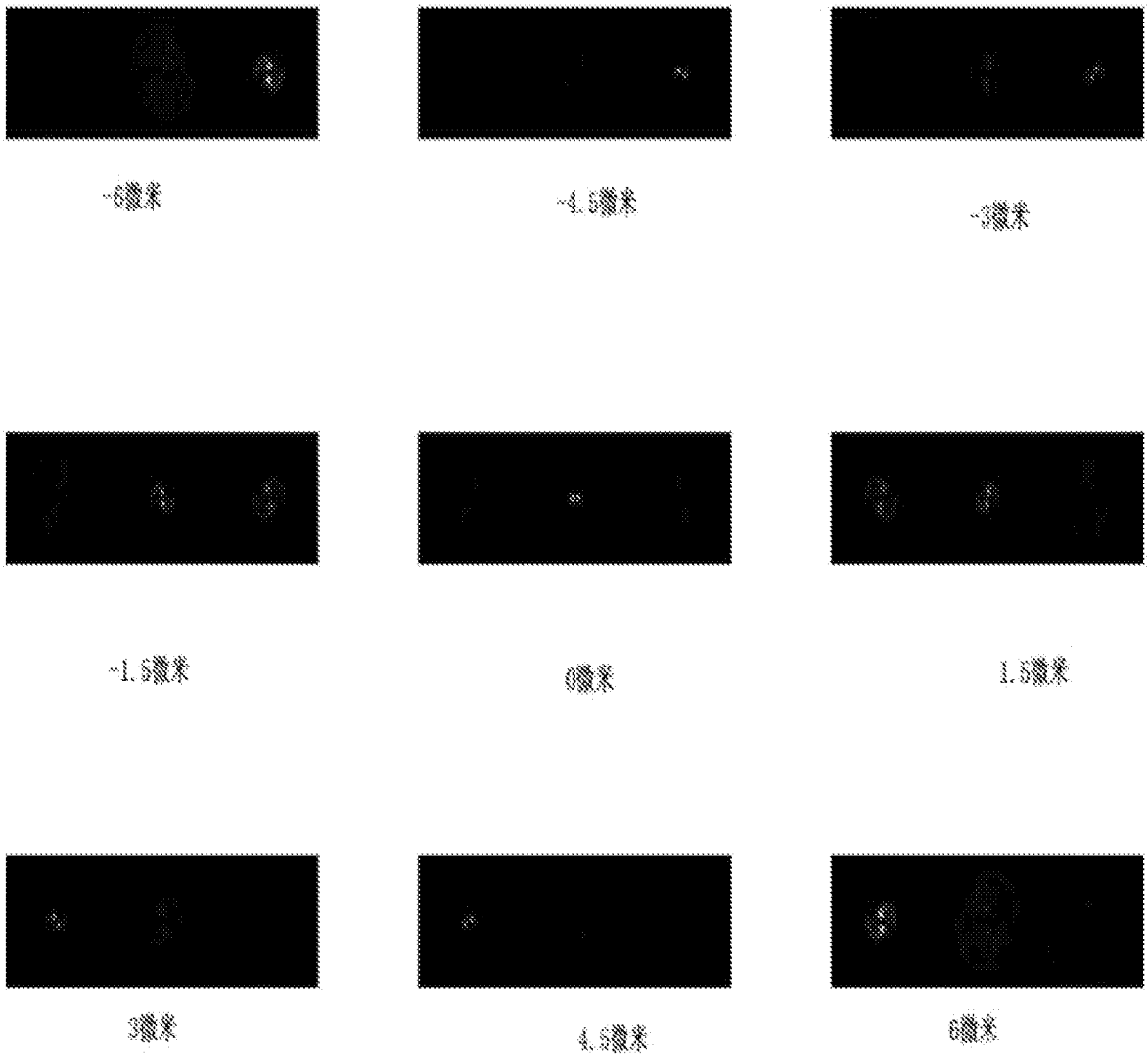


图 8

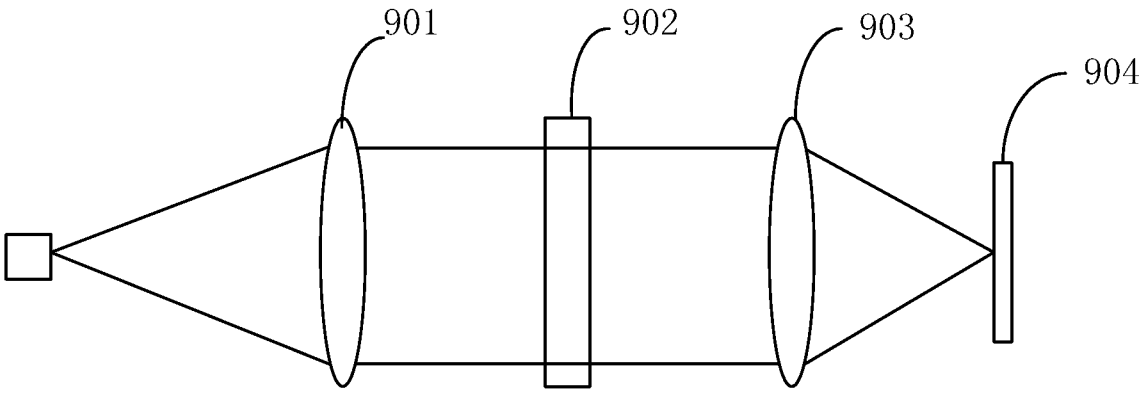


图 9

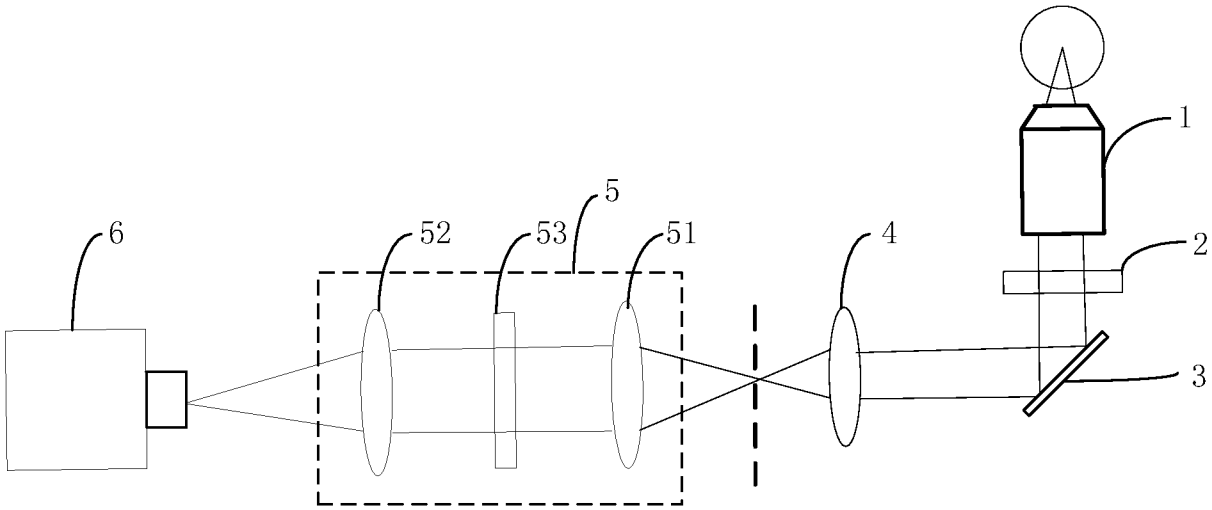


图 10

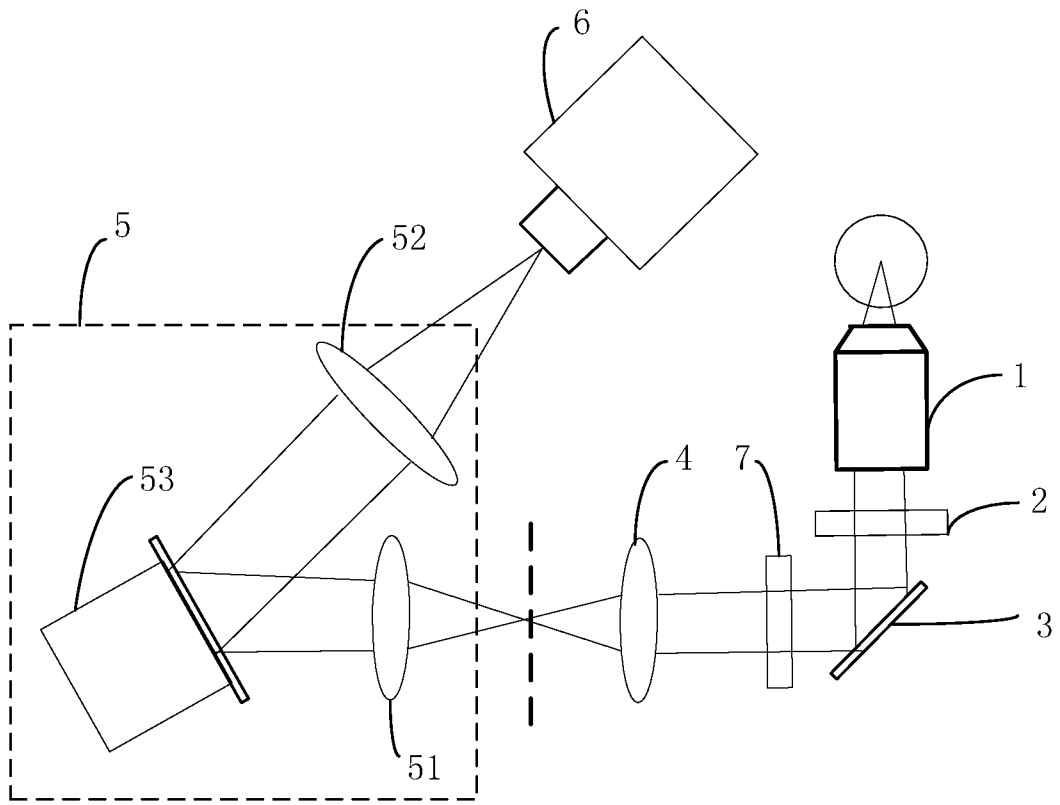


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/078029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI: double helix, point-spread, self imaging, imaging, image, out of focus, defocus, off-axis, raster, Fresnel, multistage, binary, phase, biology, molecule, front projection-reflection

VEN: psf, psfs, double 1w helix, imag+, point spread function, gauss, helical

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	CN 102980875 A (SHENZHEN UNIVERSITY), 20 March 2013 (20.03.2013), the whole document	1-10
X	US 2010278400 A1 (UNIV COLORADO et al.), 04 November 2010 (04.11.2010), description, paragraphs [0037]-[0088], figures 1A-10	1, 6, 8-10
Y	The same as above	2-5, 7
Y	CN 102222347 A (MICROSOFT CORP.), 19 October 2011 (19.10.2011), description, paragraphs [0108]-[0139], and figures 8-26D	2-5, 7
A	CN 101000389 A (NATIONAL DEFENSE UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 18 July 2007 (18.07.2007), the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 September 2013 (23.09.2013)	**17 October 2013 (17.10.2013)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **FU, Jing** Telephone No.: (86-10) **62085115**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/078029

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102980875 A	20.03.2013	None	
US 2010278400 A1	04.11.2010	None	
CN 102222347 A	19.10.2011	None	
CN 101000389 A	05.07.2006	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/078029

A. 主题的分类

G01N 21/64

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS,CNTXT, CNKI：双螺旋，点扩散，自成像，成像，图像，离焦，散焦，离轴，光栅，菲涅尔，多阶，二元，相位，生物，分子，前投反射

VEN: psf, psfs, double 1w helix, imag+, point spread function, gauss, helical

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
P，X	CN 102980875 A（深圳大学）20.3 月 2013（20.03.2013）全文	1-10
X	US2010278400 A1（UNIV COLORADO 等）04.11 月 2010（04.11.2010）说明书[0037]-[0088]，1A-图 10	1,6,8-10
Y	同上	2-5,7
Y	CN102222347 A（微软公司） 19.10 月 2011（19.10.2011）说明书第[0108]-[0139]段，图 8-图 26D	2-5,7
A	CN101000389 A（中国人民解放军国防科学技术大学）18.7 月 2007（18.07.2007）全文	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
23.9 月 2013（23.09.2013）	**17.10 月 2013 (17.10.2013)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 付婧 电话号码：(86-10) **62085115**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/078029

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102980875 A	20.03.2013	无	
US2010278400 A1	04.11.2010	无	
CN102222347 A	19.10.2011	无	
CN101000389 A	05.07.2006	无	