



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104568877 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410821470. 4

(22) 申请日 2014. 12. 25

(71) 申请人 中国科学院苏州生物医学工程技术  
研究所

地址 215163 江苏省苏州市高新区科灵路  
88 号

(72) 发明人 杨西斌 熊大曦 李辉

(74) 专利代理机构 苏州华博知识产权代理有限  
公司 32232

代理人 傅靖

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006. 01)

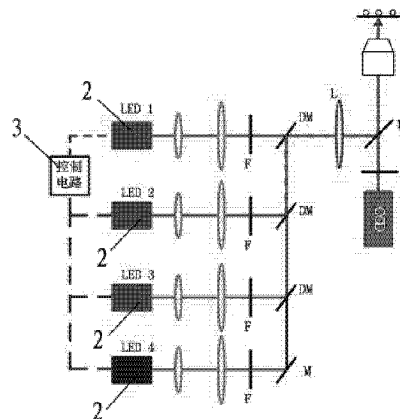
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统  
及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统,包括载物台、CCD 探测器和物镜,其还包括:多个 LED 光源,其分别形成多路光线传输路径,该 LED 光源和物镜之间还设置有滤光片、二向色镜和多个透镜,LED 光源的光线通过该滤光片、二向色镜和多个透镜到达物镜;控制电路,其连接 LED 光源,用于调节该 LED 光源的光强,同时形成多个 LED 光源之间的切换。同时,本发明还公开了一种基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法。本发明相比于现有技术,在保证成像质量的同时,还可以大大地降低成本。



1. 基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统, 包括载物台、CCD 探测器和物镜, 其特征在于, 还包括:

多个 LED 光源, 其分别形成多路光线传输路径, 所述 LED 光源和所述物镜之间还设置有滤光片、二向色镜和多个透镜, 所述 LED 光源的光线通过所述滤光片、二向色镜和多个透镜到达所述物镜;

控制电路, 其连接所述 LED 光源, 用于调节所述 LED 光源的光强, 同时形成多个所述 LED 光源之间的切换。

2. 根据权利要求 1 所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统, 其特征在于, 所述控制电路通过调节所述 LED 光源的电流大小来调节所述 LED 光源的光强。

3. 根据权利要求 1 所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统, 其特征在于, 所述控制电路通过调节所述 LED 光源的电压大小来调节所述 LED 光源的光强。

4. 根据权利要求 1 所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统, 其特征在于, 所述控制电路通过控制所述 LED 光源的电源通断来形成所述 LED 光源之间的切换。

5. 基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法, 其特征在于, 使用权利要求 1-5 任一所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统, 所述方法包括, 设置多个 LED 电源, 并过滤光片、二向色镜和多个透镜到达物镜, 设置并通过控制电路来调节所述 LED 电源的光强, 同时形成多个所述 LED 光源之间的切换。

6. 根据权利要求 5 所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法, 其特征在于, 所述控制电路通过调节所述 LED 光源的电流大小来调节所述 LED 光源的光强。

7. 根据权利要求 5 所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法, 其特征在于, 所述控制电路通过调节所述 LED 光源的电压大小来调节所述 LED 光源的光强。

8. 根据权利要求 5 所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法, 其特征在于, 所述控制电路通过控制所述 LED 光源的电源通断来形成所述 LED 光源之间的切换。

## 基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统及方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种显微技术领域的随机光学重建显微成像技术,具体涉及一种基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统及方法。

### 背景技术

[0002] 随机光学重建显微成像技术 (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, 以下简称 STORM) 是一种重要的超分辨显微手段, STORM 过程包括若干周期, 在每个周期内只有随机性的少量荧光分子发出荧光, 通过函数拟合的办法实现单分子荧光成像 (FIONA), 循环若干周期后组合获得图像, 从而实现超分辨成像。Michael J Rust 等人实现的 STORM 横向分辨率可以达到 20nm。

[0003] 具体以 Cy3-Cy5 荧光分子对为例进行说明, 在该对组合中 Cy3 作为激发物质 Cy5 作为报告物质。花青素染料 Cy3 的吸收光谱峰值波长为 532nm, Cy5 的吸收光谱峰值波长为 633nm。在显微观察前, 首先将待观察样品用染料染色, 然后用波长为 633nm 的红光照射样品使其发射荧光后全部转化为非荧光状态 (关状态), 采用波长为 532nm 的绿光激发 Cy3, 从而使 Cy5 处于荧光状态 (开状态)。激发过程中应使绿光强度足够低, 以保证在衍射极限范围内至多只有一个 Cy5 荧光分子被激发至荧光状态。而后, 用波长为 633nm 的红色激光照射待观察样品, 使处于荧光状态的 Cy5 分子发射荧光。通过电子相机读取荧光图像, 采用函数拟合的方法对图像进行处理, 进而确定每个荧光点的其中心位置。经过足够多次数循环后对获得的荧光点位置你进行叠加, 最终得到超分辨显微图像。因此, 整个成像过程中, 激光光强调节和不同激光之间的切换是关键步骤, 成像过程示意如图 1-2 所示。

[0004] 对于随机光学重建显微技术, 国内的研究尚处于起步阶段。目前的 STORM 系统均采用激光光源, 且激活激光和激发激光均采用物镜聚焦, 其结构如图 3 所示, 主要包括了多个激光器 1、偏振分束镜 (PBS)、滤光片 (F)、反射镜 (M)、透镜 (L)、二向色镜 (DM)、物面 (OBJ)、探测器 (CCD) 和声光可调滤光器 (AOTF)。

[0005] 而国外对 STORM 技术的研究相对于国内更加深入和全面, 主要包括 2D 成像、3D 和全细胞成像、多颜色染料成像等。同时, 一些结构的应用如双物镜、全内反射荧光显微镜等也提高了 STORM 的分辨能力, 如哈佛大学的 Bo Huang 等人对组织进行了 3D STORM 成像。并且国外已经有多家厂商推出了成熟的 STORM 产品, 如尼康 (Nikon) 公司的 N-STORM, 蔡司 (Zeiss) 公司的 STORM 产品等, 根据不同配置价格在人民币 180-300 万元不等, 高昂的价格限制了广泛应用。

[0006] 目前, 所有的国内外随机光学重建显微技术研究, 以及上述成熟商业设备中, 实验装置的搭建均采用激光光源, 虽然获得了较高的分辨率、信噪比和成像速度, 但是激光光源成本较高, 而且一套系统即需要多个激光光源, 很难降低成本。

### 发明内容

[0007] 为了解决上述技术问题, 本发明提供了一种可以降低成本的基于 LED 光源的随机

光学重建显微成像系统,同时还提供了一种采用该系统的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法。

[0008] 为了达到上述目的,本发明的技术方案如下:

[0009] 基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统,包括载物台、CCD 探测器和物镜,其还包括:

[0010] 多个 LED 光源,其分别形成多路光线传输路径,该 LED 光源和物镜之间还设置有滤光片、二向色镜和多个透镜,LED 光源的光线通过该滤光片、二向色镜和多个透镜到达物镜;

[0011] 控制电路,其连接 LED 光源,用于调节该 LED 光源的光强,同时形成多个 LED 光源之间的切换。

[0012] 本发明的系统通过设置控制电路和 LED 光源,实现了光强调节和光源切换的两大功能,从而可以替代现有技术中作为实现光强调节功能的激光器、半波片和偏振分束镜,另外还可以替代现有技术中作为实现光源切换的声光可调滤光器。采用激光光源时,每个光源均需一套(声光可调滤光器只需要一套,半波片和偏振分束镜是每个激光器均需一套),体积大且会导致光路调节繁琐,增加成本,本发明采用电调节方式,可以方便调节光强;现有技术使用 AOTF,价格很高,大大增加系统成本,并且光效率很低,浪费很多激光能量,本发明取消 AOTF 后便可以解决这一问题;由于 STORM 为通过对单分子荧光拟合方法获得单分子位置,因此本发明的 LED 光源与现有技术的激光相比,不会降低分辨率,而且 LED 光源为 ns 级激发速度,不会影响成像速度。

[0013] 因此,本发明相比于现有技术,在保证成像质量的同时,还可以大大地降低成本。

[0014] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以作如下改进:

[0015] 作为优选的方案,上述的控制电路通过调节 LED 光源的电流大小来调节该 LED 光源的光强。

[0016] 采用上述优选的方案,通过调节电流大小这种方式,便可以控制 LED 光源的照射强度,从而达到调节光强的目的。

[0017] 作为优选的方案,上述的控制电路通过调节 LED 光源的电压大小来调节该 LED 光源的光强。

[0018] 采用上述优选的方案,通过调节电压大小这种方式,便可以控制 LED 光源的照射强度,从而达到调节光强的目的。

[0019] 作为优选的方案,上述的控制电路通过控制 LED 光源的电源通断来形成该 LED 光源之间的切换。

[0020] 采用上述优选的方案,通过控制电源通断这种方式,便可以形成多个 LED 光源之间的切换,从而达到切换 LED 光源的目的。

[0021] 基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法,使用如上所述的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统,该方法包括,设置多个 LED 电源,并通过滤光片、二向色镜和多个透镜到达物镜,设置并通过控制电路来调节 LED 电源的光强,同时形成多个 LED 光源之间的切换。

[0022] 本发明的方法通过设置控制电路和 LED 光源,实现了光强调节和光源切换的两大功能,从而可以替代现有技术中作为实现光强调节功能的激光器、半波片和偏振分束镜,另

外还可以替代现有技术中作为实现光源切换的声光可调滤光器采用激光光源时,每个光源均需一套,体积大且会导致光路调节繁琐,增加成本,本发明采用点调节方式,可以方便调节光强;现有技术使用 AOTF,价格很高,大大增加系统成本,并且光效率很低,浪费很多激光能量,本发明取消 AOTF 后便可以解决这一问题;由于 STORM 为通过对单分子荧光拟合方法获得单分子位置,因此本发明的 LED 光源与现有技术的激光相比,不会降低分辨率,而且 LED 光源为 ns 级激发速度,不会影响成像速度。

[0023] 因此,本发明相比于现有技术,在保证成像质量的同时,还大大地降低成本。

[0024] 作为优选的方案,上述的控制电路通过调节 LED 光源的电流大小来调节该 LED 光源的光强。

[0025] 采用上述优选的方案,通过调节电流大小这种方式,便可以控制 LED 光源的照射强度,从而达到调节光强的目的。

[0026] 作为优选的方案,上述的控制电路通过调节 LED 光源的电压大小来调节 LED 光源的光强。

[0027] 采用上述优选的方案,通过调节电压大小这种方式,便可以控制 LED 光源的照射强度,从而达到调节光强的目的。

[0028] 作为优选的方案,上述的控制电路通过控制 LED 光源的电源通断来形成该 LED 光源之间的切换。

[0029] 采用上述优选的方案,通过控制电源通断这种方式,便可以形成多个 LED 光源之间的切换,从而达到切换 LED 光源的目的。

## 附图说明

[0030] 图 1 和图 2 为随机光学重建显微成像技术的成像原理图。

[0031] 图 3 为现有的随机光学重建显微成像系统的结构示意图。

[0032] 图 4 为本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统的结构示意图。

[0033] 图 5 为本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法的结构示意图。

[0034] 图 6 为本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统及方法中所涉及的控制电路的结构示意图。

[0035] 其中,1. 激光器 PBS. 偏振分束镜 F. 滤光片 M. 反射镜 L 透镜 DM. 二向色镜 OBJ. 物面 CCD. 探测器 AOTF. 声光可调滤光器 2. LED 光源 3. 控制电路。

## 具体实施方式

[0036] 下面结合附图详细说明本发明的优选实施方式。

[0037] 为了达到本发明的目的,如图 4 和 6 所示,在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统的其中一些实施方式中,设置了载物台(即物面 OBJ)、CCD 探测器和物镜(即二向色镜 DM 和滤光片 F),作为改进,其还设置了四个 LED 光源 1-4,其分别形成四路光线传输路径,该 LED 光源 2 和物镜处的二向色镜 DM 之间还设置有滤光片 F、二向色镜 DM 和多个透镜 L,LED 光源 2 的光线通过该滤光片 F、二向色镜 DM 和多个透镜 L 到物镜处的二向色镜 DM,该四个 LED 光源 2 还分别连接到了控制电路 3,该控制电路 3 用于调节该 LED 光源 2 的光强,同时形成多个 LED 光源 2 之间的切换。

[0038] 其中, LED 光源 2 还可以根据需要的频率大小来设置为两个、三个或者多于四个, 在此不再一一列举。

[0039] 本系统通过设置控制电路和 LED 光源, 实现了光强调节和光源切换的两大功能, 从而可以替代现有技术中作为实现光强调节功能的激光器、半波片和偏振分束镜, 另外还可以替代现有技术中作为实现光源切换的声光可调滤光器。采用激光光源时, 每个光源均需一套, 体积大且会导致光路调节繁琐, 增加成本, 本发明采用点调节方式, 可以方便调节光强; 现有技术使用 AOTF, 价格很高, 大大增加系统成本, 并且光效率很低, 浪费很多激光能量, 本发明取消 AOTF 后便可以解决这一问题; 由于 STORM 为通过对单分子荧光拟合方法获得单分子位置, 因此本发明的 LED 光源与现有技术的激光相比, 不会降低分辨率, 而且 LED 光源为 ns 级激发速度, 不会影响成像速度。

[0040] 因此, 本系统相比于现有技术, 在保证成像质量的同时, 还大大地降低成本。

[0041] 为了进一步地优化本发明的实施效果, 在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统的另一些实施方式中, 在上述内容的基础上, 上述的控制电路通过调节 LED 光源的电流大小来调节该 LED 光源的光强, 具体地说是可以在电路中设置滑动变阻器, 通过改变电阻来达到改变电流大小的目的, 从而达到调节 LED 光源的光强的目的。除此之外, 现有技术中还有其他已知的改变电流大小的方法, 本领域技术人员根据已知知识便可以得到, 在此不再一一列举。采用该实施方式的方案, 通过调节电流大小这种方式, 便可以控制 LED 光源的照射强度, 从而达到调节光强的目的。

[0042] 为了进一步地优化本发明的实施效果, 在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统的另一些实施方式中, 在上述内容的基础上, 上述的控制电路通过调节 LED 光源的电压大小来调节该 LED 光源的光强, 具体地说可以通过滑动变阻器或者开关电源来实现, 通过改变电阻来达到调节电压大小的目的, 从而实现对 LED 光源光强的调节。采用该实施方式的方案, 通过调节电压大小这种方式, 便可以控制 LED 光源的照射强度, 从而达到调节光强的目的。

[0043] 为了进一步地优化本发明的实施效果, 在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统的另一些实施方式中, 在上述内容的基础上, 上述的控制电路通过控制 LED 光源的电源通断来形成该 LED 光源之间的切换。采用该实施方式的方案, 通过控制电源通断这种方式, 便可以形成多个 LED 光源之间的切换, 从而达到切换 LED 光源的目的。

[0044] 为了达到本发明的目的, 如图 4-6 所示, 在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法的其中一些实施方式中, 使用本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像系统, 该方法包括, 步骤 S1: 设置多个 LED 电源, 其光线通过滤光片、二向色镜和多个透镜到达物镜; S2: 设置并通过控制电路来调节 LED 电源的光强, 同时形成多个 LED 光源之间的切换。

[0045] 本方法通过设置控制电路和 LED 光源, 实现了光强调节和光源切换的两大功能, 从而可以替代现有技术中作为实现光强调节功能的激光器、半波片和偏振分束镜, 另外还可以替代现有技术中作为实现光源切换的声光可调滤光器。采用激光光源时, 每个光源均需一套, 体积大且会导致光路调节繁琐, 增加成本, 本发明采用点调节方式, 可以方便调节光强; 现有技术使用 AOTF, 价格很高, 大大增加系统成本, 并且光效率很低, 浪费很多激光能量, 本发明取消 AOTF 后便可以解决这一问题; 由于 STORM 为通过对单分子荧光拟合方

法获得单分子位置,因此本发明的 LED 光源与现有技术的激光相比,不会降低分辨率,而且 LED 光源为 ns 级激发速度,不会影响成像速度。

[0046] 因此,本方法相比于现有技术,在保证成像质量的同时,还大大地降低成本。

[0047] 为了进一步地优化本发明的实施效果,在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法的另一些实施方式中,在上述内容的基础上,上述的控制电路通过调节 LED 光源的电流大小来调节该 LED 光源的光强,其具体调节内容参照上述的系统的所述相关内容。采用该实施方式的方案,通过调节电流大小这种方式,便可以控制 LED 光源的照射强度,从而达到调节光强的目的。

[0048] 为了进一步地优化本发明的实施效果,在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法的另一些实施方式中,在上述内容的基础上,上述的控制电路通过调节 LED 光源的电压大小来调节 LED 光源的光强,其具体调节内容参照上述的系统的所述相关内容。采用该实施方式的方案,通过调节电压大小这种方式,便可以控制 LED 光源的照射强度,从而达到调节光强的目的。

[0049] 为了进一步地优化本发明的实施效果,在本发明的基于 LED 光源的随机光学重建显微成像方法的另一些实施方式中,在上述内容的基础上,上述的控制电路通过控制 LED 光源的电源通断来形成该 LED 光源之间的切换,其具体切换内容参照上述的系统的所述相关内容。采用该实施方式的方案,通过控制电源通断这种方式,便可以形成多个 LED 光源之间的切换,从而达到切换 LED 光源的目的。

[0050] 以上所述的仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

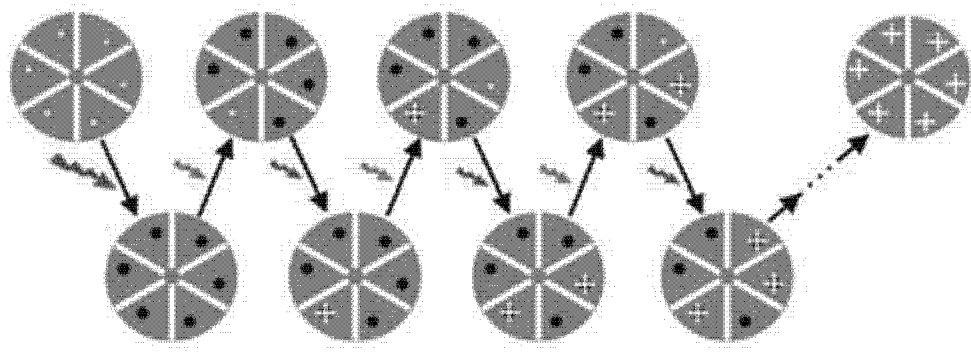


图 1

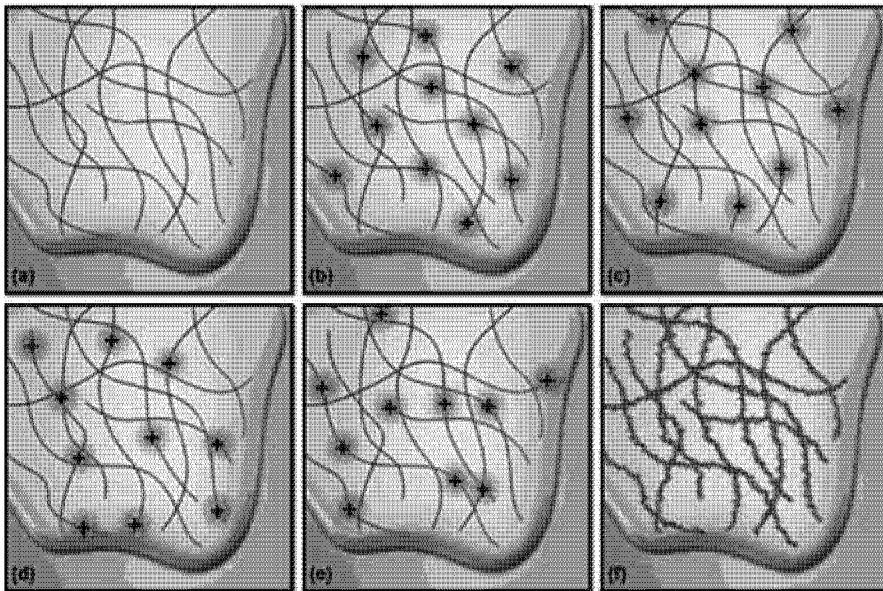


图 2



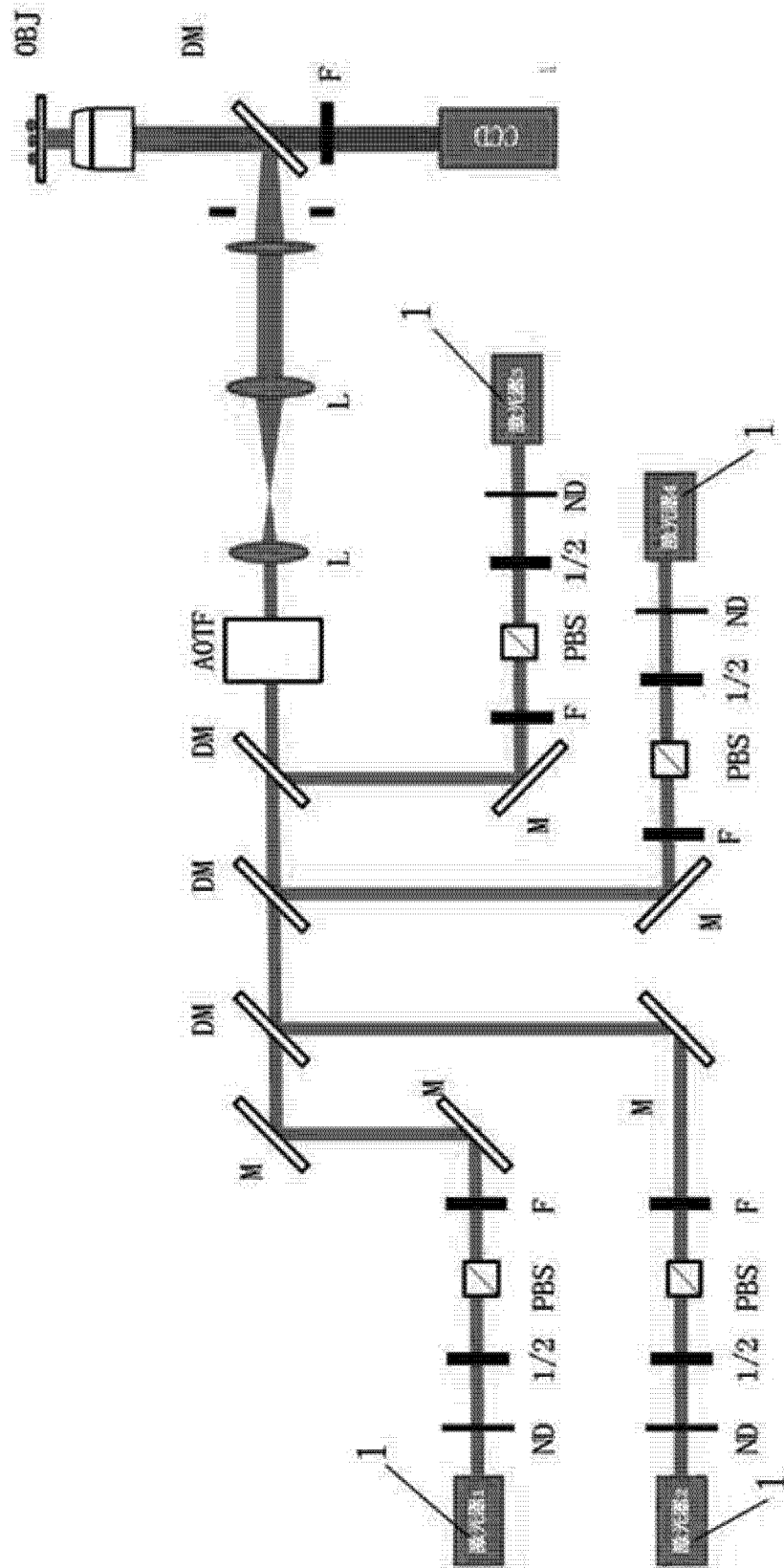


图 3

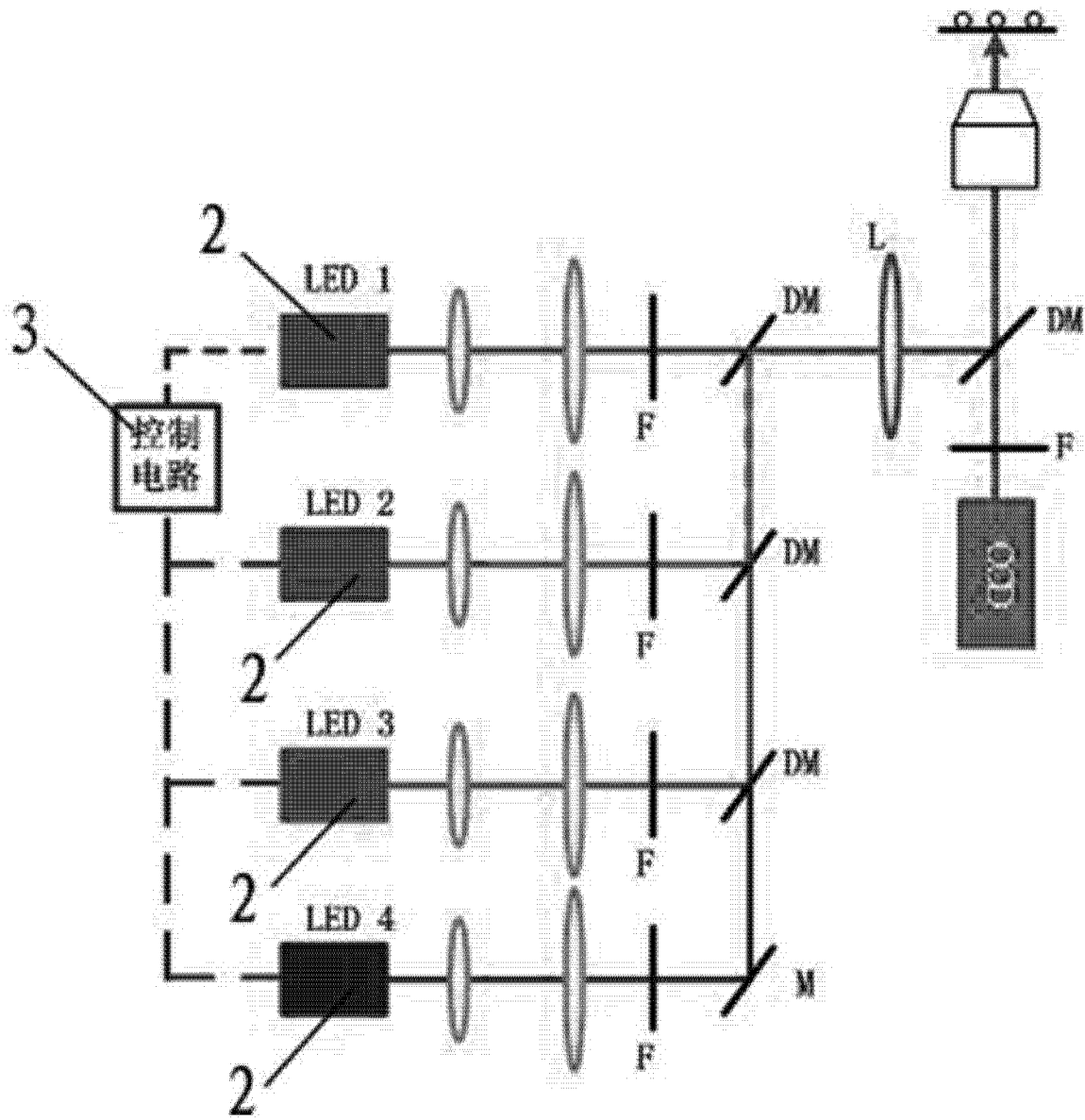


图 4

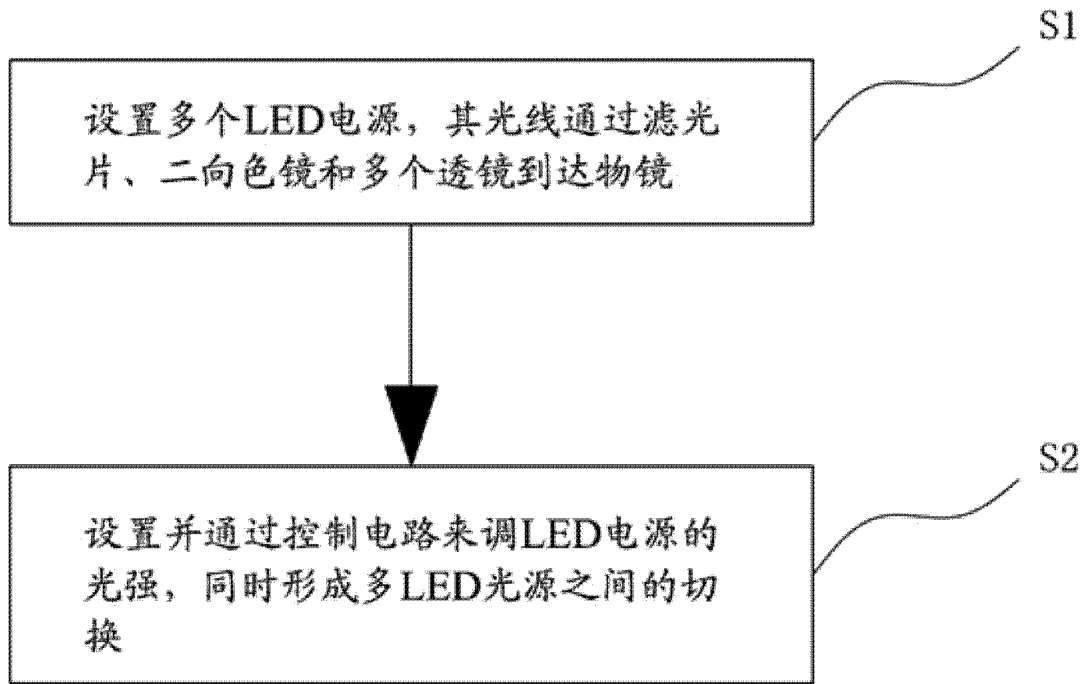


图 5

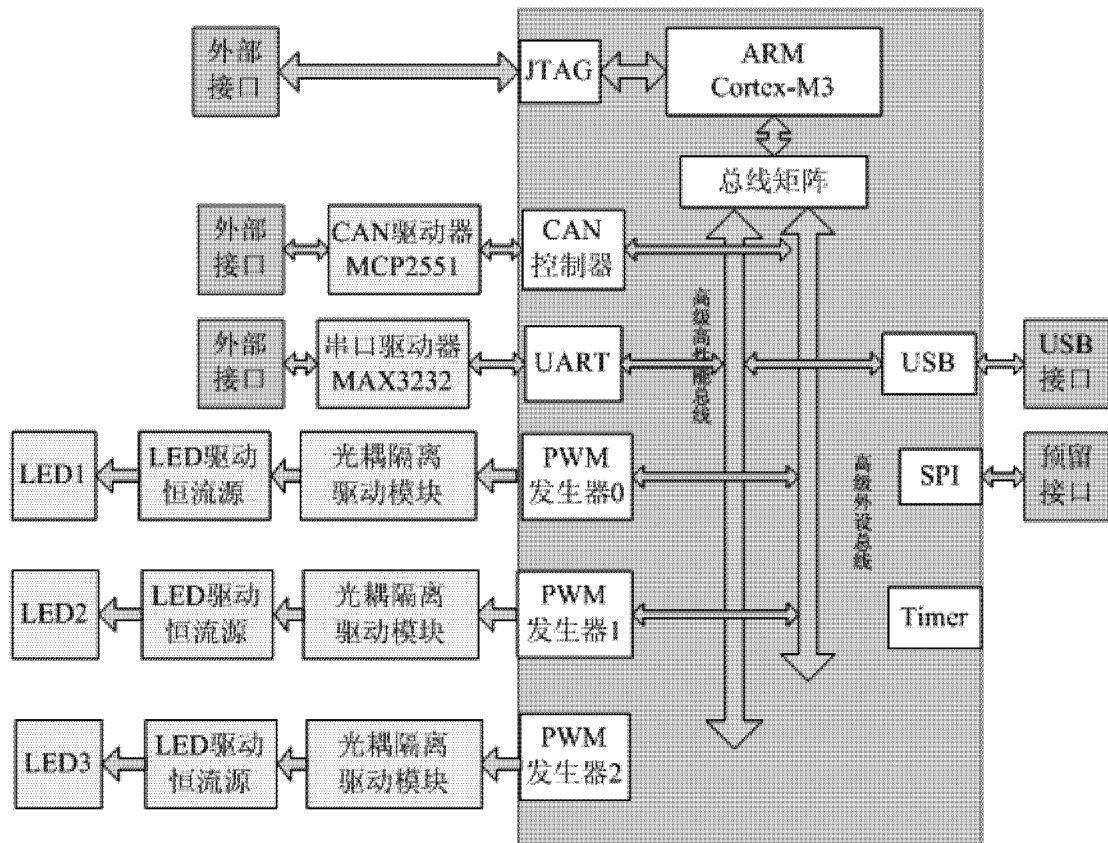


图 6