



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106970055 A

(43)申请公布日 2017.07.21

(21)申请号 201710295881.8

(22)申请日 2017.04.28

(71)申请人 浙江大学

地址 310013 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 刘旭 朱大钊 陈友华 刘文杰 匡翠方 张克奇 毛磊

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 胡红娟

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

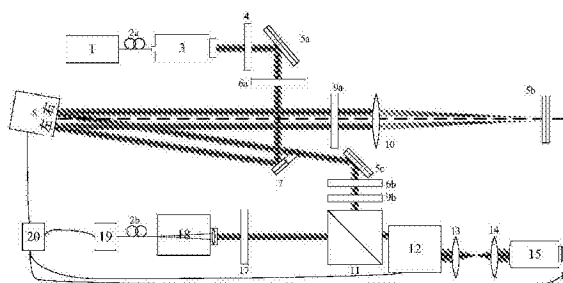
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种三维荧光差分超分辨显微方法及装置

(57)摘要

本发明公开一种三维荧光差分超分辨显微装置,包括激光器、承载待测样品的电动样品台和将光线投射到所述电动样品台的显微物镜;所述的激光器和显微物镜之间依次设有:用于将所述激光器发出的光束改变为线偏振光的起偏器;用于调制所述线偏振光偏振方向的第一二分之一波片;用于依次调制光束水平分量和垂直分量的空间光调制模块;用于对圆偏振光进行光路偏转的扫描振镜系统,由所述扫描振镜系统出射的圆偏振光经显微物镜投射到待测样品上;还包括采集待测样品发出的信号光的探测系统,以及控制所述空间光调制模块和扫描振镜系统的计算机。本发明还公开基于上述三维荧光差分超分辨显微装置实现的显微方法。



1. 一种三维荧光差分超分辨显微装置,包括激光器、承载待测样品的电动样品台和将光线投射到所述电动样品台的显微物镜,其特征在于:

所述的激光器和显微物镜之间依次设有:

用于将所述激光器发出的光束改变为线偏振光的起偏器;

用于调制所述线偏振光偏振方向的第一二分之一波片;

用于依次调制光束水平分量和垂直分量的空间光调制模块;

用于对圆偏振光进行光路偏转的扫描振镜系统,由所述扫描振镜系统出射的圆偏振光经显微物镜投射到待测样品上;

还包括采集待测样品发出的信号光的探测系统,以及控制所述空间光调制模块和扫描振镜系统的计算机。

2. 如权利要求1所述的三维荧光差分超分辨显微装置,其特征在于:所述的空间光调制模块包括:

空间光调制器,由所述计算机控制加载黑色背景或同时加载 $0\sim\pi$ 相位调制图案和 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调图案;

反射镜,用于将空间光调制器反射的光束再次反射进入空间光调制器内;

位于所述空间光调制器和反射镜之间的第一四分之一波片,用于将两次经过的光束的偏振方向转过90度。

3. 如权利要求1所述的三维荧光差分超分辨显微装置,其特征在于:所述的空间光调制模块和扫描振镜系统间设有用于将偏振光转换为圆偏振光的第二二分之一波片和第二四分之一波片。

4. 如权利要求3所述的三维荧光差分超分辨显微装置,其特征在于:由所述第一二分之一波片出射的光束经一D形反射镜后入射至空间光调制模块。

5. 如权利要求1所述的三维荧光差分超分辨显微装置,其特征在于:所述的探测系统包括:

布置在第二四分之一波片和扫描振镜系统间的分束镜,

用于探测信号光束的光强信号的探测器,

用于将滤光后的信号光束聚焦到探测器上的聚焦透镜,

和用于对所述信号光束进行空间滤波的空间滤波器。

6. 一种基于权利要求1~5任一项所述三维荧光差分超分辨显微装置实现的显微方法,其特征在于,包括步骤:

1) 激光器发出的激光光束在准直后转换为线偏振光;

2) 调节第一二分之一波片,使光束的偏振方向与空间光调制器可调节偏振方向成 $\alpha$ 角;

3) 将偏振光入射至空间光调制器的屏幕一侧,利用该侧加载的 $0\sim\pi$ 相位调制图案对偏振光进行相位调制;

4) 控制空间光调制器反射后的光束重新折返入射至空间光调制器的屏幕另一侧,利用该侧加载的 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调图案进行相位调制;

5) 两次调制后的激光光束在转化为圆偏后经扫描振镜系统和显微物镜聚焦到样品上并进行扫描;

6) 在扫描过程中实时收集被测样品各被激发点发出的信号光,得到一次扫描信号光强

$I_1(x, y, z)$ ;

7) 将步骤3) 和步骤4) 内的空间光调制器上仅加载黑色背景, 重复步骤3) ~6), 对相同的三维空间进行第二次扫描, 得到二次扫描信号光强  $I_2(x, y, z)$ ;

8) 根据公式  $I(x, y, z) = I_2(x, y, z) - r \times I_1(x, y, z)$  计算最终信号光强  $I(x, y, z)$ , 并利用  $I(x, y, z)$  得到超分辨图像; 其中  $r = I_2^{\max} / 2 \times I_1^{\max}$ ,  $I_2^{\max}$  为  $I_2(x, y, z)$  的最大值,  $I_1^{\max}$  为  $I_1(x, y, z)$  中的最大值。

7. 如权利要求6所述的显微方法, 其特征在于, 当待测样品为荧光样品时, 所述信号光为圆偏振光经显微物镜投射后在样品上激发出的荧光; 当待测样品为非荧光样品时, 所述信号光为圆偏振光经显微物镜投射后经样品表面的反射光束。

8. 如权利要求6所述的显微方法, 其特征在于, 若最终信号光强  $I(x, y, z)$  为负值时, 令  $I(x, y, z) = 0$ 。

9. 如权利要求6所述的显微方法, 其特征在于, 所述显微物镜的数值孔径  $NA = 1.49$ 。

10. 如权利要求6所述的显微方法, 其特征在于, 在步骤2) 中, 调节第一二分之一波片的快轴, 使得光束的偏振方向与水平方向夹角为  $54.5^\circ$ 。

## 一种三维荧光差分超分辨显微方法及装置

### 技术领域

[0001] 本发明属于光学超分辨显微领域,特别涉及一种三维荧光差分超分辨显微方法及装置。

### 背景技术

[0002] 1873年,德国科学家Abbe提出光学成像系统的“衍射极限”,任何光学显微镜都存在一个分辨率极限,由光波长以及透镜的数值孔径决定。光学显微成像系统由于“衍射极限”的存在,在可见光波段无法实现200纳米以下的高分辨成像。为此人们不断努力,研究发展超分辨成像技术,希望突破衍射极限,获得更高的分辨率。2014年从事荧光超分辨光学显微术的三位科学家获得了诺贝尔化学奖,他们开启了人类利用荧光标记方法实现超分辨显微的大门。从此,人类的光学显微已进入超分辨时代。

[0003] 现在主流超分辨显微成像技术可以大致分为两类:一类是基于经典共焦系统,如受激辐射淬灭显微术(STED),荧光发射微分显微术(FED);另一类是基于宽场成像系统,如随机光学重组显微术(STORM)、结构光照明显微术(SIM)、光子活化定位显微术(PALM)等等。近年来,超分辨技术得到了迅猛发展,其发展方向已经不在单单局限于横向分辨率的提高,而是向着提高三维分辨率、提高成像速度、系统集成化紧凑化发展。以上提到的超分辨显微术中,有的已经向三维方向发展,为医学或生物学家提供更多的微观信息。

[0004] 随着分辨率的提升,光学超分辨显微方法和装置越来越受到医学和生物学领域研究人员的青睐。其快速直观无损的特定,使其得到了更多的应用,因此,高集成化、易使用,高分辨率的光学超分辨显微装置也成为了研究者们关注的重点。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了一种三维荧光差分超分辨显微方法及装置,可以实现超越衍射极限的三维分辨率。系统结构紧凑,单激发光路,调校方便,该方法装置简单,成像速度快,对样品没有特殊荧光染料要求。可应用于生物、医学研究中对衍射极限一下微观结构细节的三维成像。

[0006] 本发明的具体技术方案如下:一种三维荧光差分超分辨显微装置,包括激光器、承载待测样品的电动样品台和将光线投射到所述电动样品台的显微物镜,所述激光器与显微物镜之间依次设有:

[0007] 用于将所述激光器发出的激光转换为平行光的准直器;

[0008] 用于将所述激光器发出的光束改变为线偏振光的起偏器;

[0009] 用于调制所述光束偏振方向的第一二分之一波片;

[0010] 用于依次调制光束水平分量和垂直分量的空间光调制模块;

[0011] 用于对所述相位调制后的光束进行光路偏转的扫描振镜系统;所述圆偏振光通过所述显微物镜投射到所述待测样品上;

[0012] 依次布置的分别用于对所述扫描振镜系统出射的光束进行聚焦和准直的扫描透

镜和场镜；

[0013] 并设有用于控制所述空间光调制器和扫描振镜系统的控制器及收集所述待测样品发出的信号光的探测系统。

[0014] 优选的,所述的空间光调制模块包括:

[0015] 空间光调制器,由所述计算机控制加载黑色背景或同时加载 $0\sim\pi$ 相位调制图案和 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调图案;

[0016] 反射镜,用于将空间光调制器反射的光束再次反射进入空间光调制器内;

[0017] 位于所述空间光调制器和反射镜之间的第一四分之一波片,用于将两次经过的光束的偏振方向转过90度。

[0018] 进一步优选的,所述的空间光调制模块和扫描振镜系统间设有用于将偏振光转换为圆偏振光的第二二分之一波片和第二四分之一波片。

[0019] 本发明中,探测系统包括:

[0020] 布置在第二四分之一波片和扫描振镜系统之间的分束镜。所述分束镜在待测样品为荧光样品时应选用二色镜。

[0021] 用于滤去分束镜出射的信号光中的杂散光的带通滤波片,所述带通滤波片在待测样品为非荧光样品时可以省略;

[0022] 用于探测信号光束的光强信号的探测器,所述探测器选用光电倍增管(PMT)或雪崩光电二极管(APD);

[0023] 用于将滤光后的信号光束聚焦到探测器上的聚焦透镜;用于对所述信号光束进行空间滤波的空间滤波器,其位于所述聚焦透镜的焦平面处,所述空间滤波器可以采用针孔或多模光纤,若采用针孔,所用针孔的直径应小于一个艾里斑直径。

[0024] 所述激光器与起偏器之间依次设有用于对所述激光光束进行滤波的单模光纤。

[0025] 所述空间光调制器液晶屏幕在左右两侧同时加载 $0\sim\pi$ 相位调制图案和 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调图案;

[0026] 空间光调制器中加载调制图案和黑色背景的切换频率与扫描振镜系统的空间扫描频率相同,从而实现扫描振镜系统配合电动样品台每扫描一次三维空间,空间光调制器的调制函数切换一次。

[0027] 优选的,所述显微物镜的数值孔径 $NA=1.49$ 。

[0028] 根据上述的三维荧光差分超分辨显微装置,本发明的显微方法包括以下步骤:

[0029] 1) 激光器发出的激光光束在准直后转换为线偏振光;

[0030] 2) 调节第一二分之一波片,使光束的偏振方向与空间光调制器可调节偏振方向成 $\alpha$ 角;

[0031] 3) 将偏振光入射至空间光调制器的屏幕一侧,利用该侧加载的 $0\sim\pi$ 相位调制图案对偏振光进行相位调制;

[0032] 4) 控制空间光调制器反射后的光束重新折返入射至空间光调制器的屏幕另一侧,利用该侧加载的 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调图案进行相位调制;

[0033] 5) 两次调制后的激光光束在转化为圆偏后经扫描振镜系统和显微物镜聚焦到样品上并进行扫描;

[0034] 6) 在扫描过程中实时收集被测样品各被激发点发出的信号光,得到一次扫描信号

光强 $I_1(x, y, z)$ ;

[0035] 7) 将步骤3) 和步骤4) 内的空间光调制器上仅加载黑色背景, 重复步骤3) ~6), 对相同的三维空间进行第二次扫描, 得到二次扫描信号光强 $I_2(x, y, z)$ ;

[0036] 8) 根据公式 $I(x, y, z) = I_2(x, y, z) - r \times I_1(x, y, z)$  计算最终信号光强 $I(x, y, z)$ , 并利用 $I(x, y, z)$  得到超分辨图像; 其中 $r = I_2^{\max} / 2 \times I_1^{\max}$ ,  $I_2^{\max}$  为 $I_2(x, y, z)$  的最大值,  $I_1^{\max}$  为 $I_1(x, y, z)$  中的最大值。

[0037] 本发明中, 当待测样品为荧光样品时, 所述信号光为所述圆偏振光经显微物镜投射后在样品上激发出的荧光; 当待测样品为非荧光样品时, 所述信号光为所述圆偏振光经显微物镜投射后经样品表面的反射光束。

[0038] 其中, 被测样品上 $x, y, z$  轴方向由三维扫描方式决定。

[0039] 作为优选的, 最终信号光强 $I(x, y, z)$  为负值时, 令 $I(x, y, z) = 0$ 。

[0040] 本发明原理如下:

[0041] 根据经典衍射理论, 实际光学系统对平行光的聚焦效果, 并非理想的点, 而是一个可计算其空间尺寸的梭形空间分布, 长轴延光轴方向, 在焦面上即衍射斑或艾里斑。艾里斑范围内的样品都会被激发从而发出信号光, 使得在艾里斑范围内的样品细节无法被分辨。因此, 显微系统的分辨率受到衍射极限的限制。所以, 突破衍射极限的限制, 提高显微系统的分辨率, 减小艾里斑面积是关键。理论上艾里斑是无法通过光学器件减小的, 但是可以通过其他手段减小系统最终的等效激发面积, 从而达到提高分辨率的目的。同理对于三维超分辨而言, 提高显微镜分辨率, 减小空间聚焦光斑的体积是关键。

[0042] 在本发明方法中, 空间光调制器左侧加载 $0 \sim \pi$  相位调制图案右侧加载 $0 \sim 2\pi$  涡旋相位调制图案。当光束被 $0 \sim \pi$  相位调制后, 根据矢量光场衍射理论, 由狄拜积分计算可知, 此时光束经显微物镜聚焦后的光场, 在焦面空间附近为一强度极弱的空心圆柱, 圆柱两端为强度较强的细实心圆柱。当光束被 $0 \sim 2\pi$  涡旋相位调制后, 同理可计算得到, 此时光束经显微镜物镜聚焦后在焦面空间附近为一个空心圆柱分布, 在焦面上为一个甜甜圈形空心光斑

[0043] 光束首先入射到空间光调制器的左侧, 此时空间光调制器左侧加载的 $0 \sim \pi$  相位图案只对光束水平方向的分量进行调制, 垂直分量未被调制。当光束经偏振旋转 $90^\circ$  后, 再次入射到空间光调制器上左侧时, 之前的水平分量变为垂直分量, 其不会被再次调制, 之前的垂直分量变为水平分量, 被空间光调制器右侧加载的 $0 \sim 2\pi$  涡旋相位图案调制。这样, 两个方向的分量被不同的调制图案进行调制, 此时光束经显微物镜聚焦到焦面时, 上述两种空间光场分布叠加, 在焦面附近得到近似的空心椭球体光场分布, 长轴延光轴方向。该空心椭球激发范围激发样品所得信号光强为 $I_1(x, y, z)$ 。

[0044] 当空间光调制器加载黑色背景是, 理论上不对激发光做任何调制, 我们可以认为空间光调制器只起到平面反射镜的作用。此时, 由狄拜积分计算可知, 光束经显微成像物镜聚焦后在焦面附近为一个实心光斑。该实心光斑激发范围内激发样品所得信号光强为 $I_2(x, y, z)$ 。根据公式 $I(x, y, z) = I_2(x, y, z) - r \times I_1(x, y, z)$  计算最终信号光强 $I(x, y, z)$ 。显然 $I(x, y, z)$  所对应的各扫描点处的有效信号光发光体积将小于 $I_2(x, y, z)$  所对应的各扫描点处发光体积。因此, 与常规光学显微方法相比, 本发明减小了有效信号光的发光体积, 从而实现超衍射极限的分辨率。

[0045] 相对于现有的技术,本发明具有以下有益的技术效果:

[0046] (1) 可以实现在较低激发光功率的前提下,提供三维超衍射极限的分辨率;

[0047] (2) 由于只需要两次扫描,相比于以往类似方法3次扫描的系统,成像速度提高三分之一。

[0048] (3) 单激发光路,使得系统紧凑,省去多路调重合的步骤,易于调校。

[0049] (4) 单空间光调制器加载两幅调制图案,简约成本。

## 附图说明

[0050] 图1为本发明中基于荧光受激发射微分的三维超分辨装置示意图;

[0051] 图2为本发明中 $0\sim\pi$ 相位调制图案;

[0052] 图3为本发明中被 $0\sim\pi$ 相位调制后,光束聚焦得到的焦面xy方向及xz方向的光场分布;

[0053] 图4为本发明中 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调制图案;

[0054] 图5为本发明中被 $0\sim 2\pi$ 相位调制后,光束聚焦得到的焦面xy方向及xz方向的光场分布;

[0055] 图6本发明中光束经两次调制后聚焦后的焦面xy方向及xz方向的光场分布;

[0056] 图7为普通共聚焦显微镜焦面处xy方向光场分布与本发明方法焦面处xy方向光场分布,即普通共焦显微镜横向有效发光面积和本发明系统横向有效发光面积;

[0057] 图8为普通共聚焦显微镜焦面处xz方向光场分布与本发明方法焦面处xz方向光场分布,即普通共焦显微镜纵向有效发光面积和本发明系统纵向有效发光面积。

## 具体实施方式

[0058] 下面结合实施例和附图来详细说明本发明,但本发明并不仅限于此。

[0059] 如图1所示三维荧光差分超分辨显微,包括:激光器1,单模光纤2a,准直器3,起偏器4,反射镜5a,1/2波片6a,D形反射镜7,空间光调制器8,1/4波片9a,透镜10,反射镜5b,反射镜5c,1/2波片6b,1/4波片9b,四带通二色镜11,振镜扫描系统12,扫描镜13,场镜14,显微物镜15,样品台16,四带通滤波片17,电动小孔18,单模光纤2b,探测器19,控制系统及PC机20。

[0060] 其中,单模光纤2a、准直器3、起偏器4和反射镜5a依次位于激光器1出射的光轴之上,起偏器4的透光轴方向应使得透射后的光强最大。

[0061] 其中,D形反射镜位于折转后的激光器1光轴之上,并将光束第一次折转入射至空间光调制器8左侧。

[0062] 其中,1/4波片9a、透镜10、反射镜5b位于空间光调制器8折转后的光束光轴之上,反射镜5b也位于透镜10的焦面上。

[0063] 光束被反射镜5b反射,并再次经过1/4波片9a、透镜10入射到空间光调制器右侧,第二次经空间光调制器反射至反射镜5c,由5c对光束进行转折。其中1/2波片6b,1/4波片9b及四带通二色镜11位于经反射镜5c折转后的光轴上。

[0064] 光束被二色镜11反射进入振镜扫描系统12,其中扫描镜13、场镜14、显微物镜15和电动样品台16依次位于扫描振镜系统出射光束的光轴上。电动样品台16位于物镜15焦面

处。

[0065] 四带通滤波片17、电动小孔18和探测器19位于信号光光轴上。

[0066] 控制系统及PC机20与空间光调制器8、探测器19及扫描振镜系统相连接,用于控制空间光调制器8上图案的切换。空间光调制器在上位PC机及控制系统20的控制下,在相位调制图案和黑色背景间切换。

[0067] 上述装置中,显微物镜15的数值孔径 $NA=1.49$ ;所用小孔为一电动小孔装置,其自带聚焦透镜和可切换直径的一系列小孔,在本发明中装置中使用0.7个艾里斑的小孔;探测器19为光电倍增管(PMT)。

[0068] 采用图1所示装置实现三维超分辨的过程如下:

[0069] 激光器1发出的光束耦合进单模光纤2a中,通过单模光纤2a导入准直器3,光束从准直器3出射后为平行光,经偏振片4转换为线偏振光。经过反射镜5a,1/2波片6a和D形反射镜7入射到空间光调制器8左侧。其中,调节1/2波片快轴,使得光束的偏振方向与水平方向夹角为54.5度。此时空间光调制器8左侧加载 $0\sim\pi$ 相位调制图案,如图2所示。 $0\sim\pi$ 相位调制的调制函数可以用极坐标 $(\theta,\varphi)$ 表示为,

$$[0070] \quad \Delta\alpha_{na}(\theta,\varphi) = \begin{cases} \pi, & \theta < \sqrt{2}/2 \theta_{\max} \\ 0, & \theta \geq \sqrt{2}/2 \theta_{\max} \end{cases}$$

[0071] 其中, $\theta_{\max}$ 为入射光半径的最大值;

[0072] 此时,偏振方向与水平方向成54.5度的光束的水平分量被上述 $0\sim\pi$ 相位调制函数调制。其在转化成圆偏光后,经物镜聚焦后的焦面附近处光场分布如图3所示。光束被空间光反射,经过1/4波片9a和透镜10,被反射镜5b反射后,再次经过透镜10和1/4波片9a,入射到空间光调制器右侧。反射镜5b位于透镜10的焦点上,使得反射镜的面形对光束波前的影响降到最低。调节1/4波片9a的快轴,使得入射偏振光束两次经过1/4波片9后,偏振方向转过90度入射到空间光调制器8右侧。空间光调制器右侧加载 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调制图案,如图4所示,其相位调制函数可以写成:

$$[0073] \quad \Delta\alpha(\theta,\varphi) = \varphi, \quad \varphi \in [0, 2\pi]$$

[0074] 此时,之前被空间光调制器8左侧图案调制的水平分量变为垂直分量,无法被调制。之前未被调制的垂直分量变为水平分量,即被空间光调制器8右侧加载的 $0\sim 2\pi$ 涡旋相位调制图案调制。该分量转化为圆偏光后,经物镜聚焦后的焦面附近处光场分布如图5所示。

[0075] 光束经空间光调制器右侧反射后,再被反射镜5c反射,经过1/2波片6b和1/4波片9b转化为圆偏光。圆偏振光束经四带通二色镜11反射,进入振镜扫描系统12,再经扫描镜13和场镜14进入物镜15,聚焦到样品面上,其光场分布如图6所示,即为图3和图5所示光场的叠加。样品上被圆偏光束激发的区域,发出信号光,经场镜14、扫描镜13、振镜系统12、四带通二色镜11、四带通滤光片17进入电动小孔18,由电动小孔18自带的透镜聚焦至小孔,再由单模光纤2b将信号光导入探测器19,进而进入PC机20内存。

[0076] 控制器及PC机20和空间光调制器8、探测器19、振镜扫描系统12及电动样品台相连。由控制器及PC机20控制振镜扫描系统12及电动样品台16完成三维空间的逐点扫描,并记录各点信号,从而得到信号光强 $I_1(x,y,z)$ 。

[0077] 通过控制器调整空间光调制器8上的图案,使其全屏加载黑色背景,重复上述步骤,得到信号光强 $I_2(x,y,z)$ 。利用公式 $I(x,y,z) = I_2(x,y,z) - r \times I_1(x,y,z)$ 得到最终有效信号光强 $I(x,y,z)$ 。普通共聚焦显微镜焦面处xy方向光场分布与本发明所述方法焦面处xy方向光场分布如图7所示。普通共聚焦显微镜焦面处xz方向光场分布与本发明所述方法焦面处xz方向光场分布如图8所示。

[0078] 以上所述仅为本发明的较佳实施举例,并不用于限制本发明,凡在本发明精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

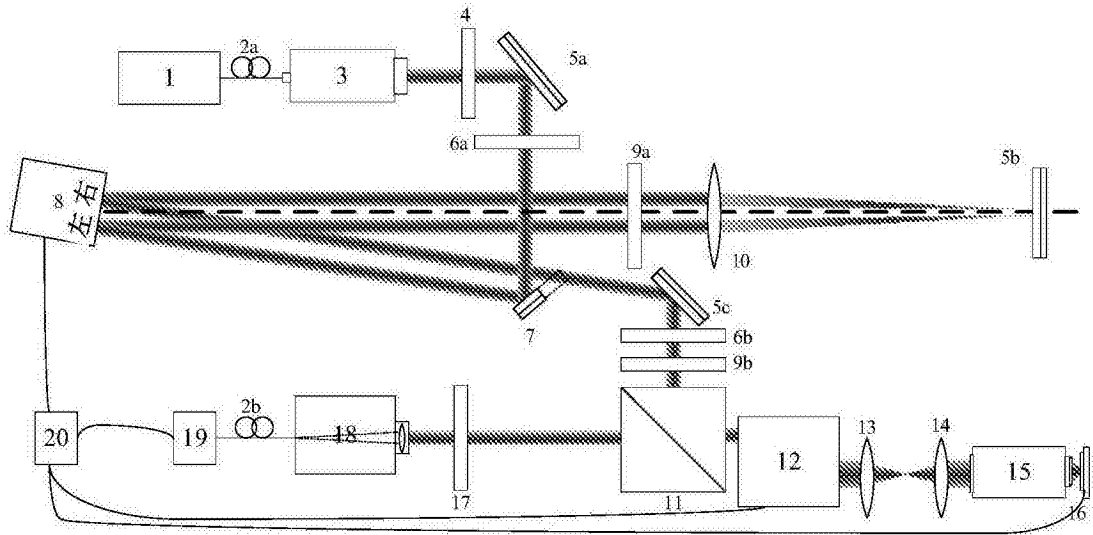


图1

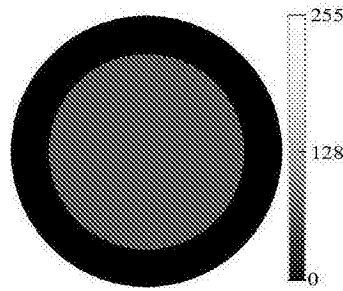


图2

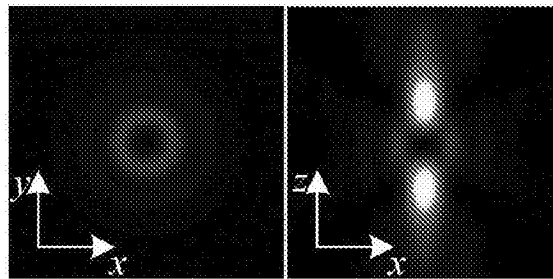


图3

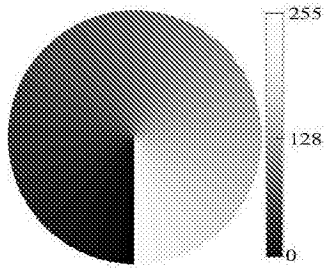


图4

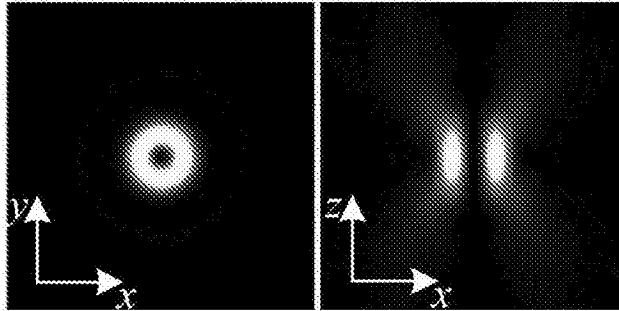


图5

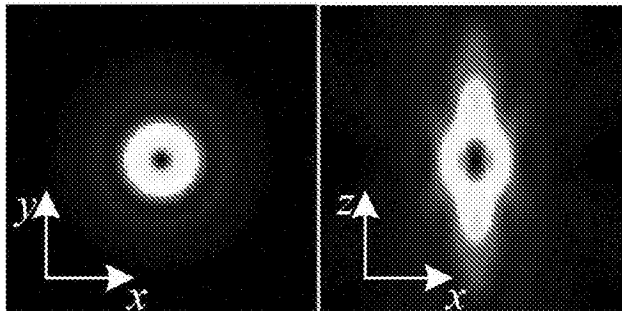


图6

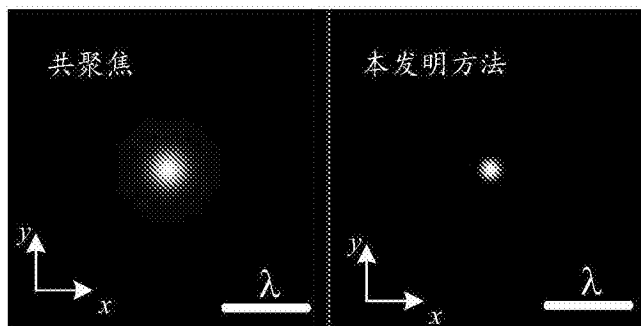


图7

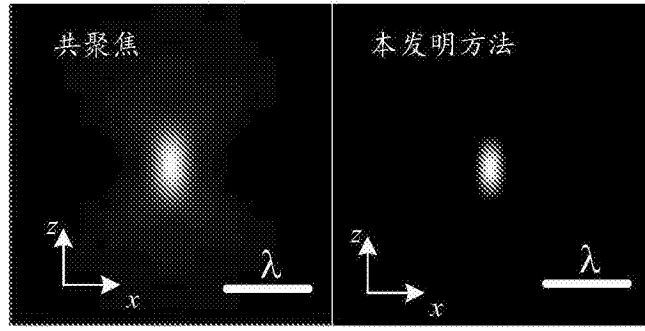


图8