



(21) 申请号 202510119970.1

(22) 申请日 2025.01.25

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 119555656 A

(43) 申请公布日 2025.03.04

(73) 专利权人 浙江师范大学

地址 321004 浙江省金华市婺城区迎宾大道688号

(72) 发明人 李传康 卢禹先 陈达如 匡翠方

(74) 专利代理机构 杭州奥创知识产权代理有限公司 33272

专利代理师 王佳健

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 113466187 A, 2021.10.01

CN 118443630 A, 2024.08.06

审查员 李佩

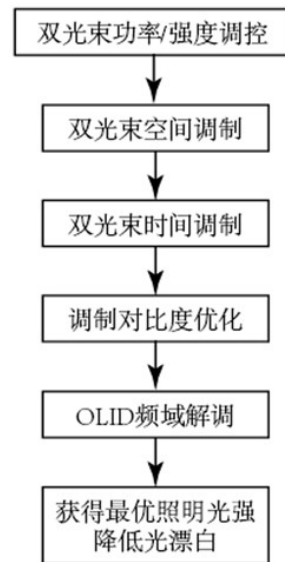
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种降低光漂白的超分辨显微方法

(57) 摘要

本发明公开了一种降低光漂白的超分辨显微方法。在本发明中,两个激光器发射的光束同步投射至荧光样本上,其中一个光束经过相位调制后,在样品面上形成高强度的环形光斑;而另一光束则保持低光强的实心光斑状态。通过时间调制器件对两束光分别加载不同频率的调制,实时调控环形光束的调制对比度;此外在探测端采用光学锁相探测技术,替代传统方法中昂贵的锁相硬件设备,将信号从空间域转到频域,在获得相同空间分辨率的情况下。该方法所需的光功率更低,从而缓解成像系统对样品的光漂白性和光毒性影响。本方法无需在染料上做改动,设计简洁,操作便捷,对于生物样品的高分辨率成像具有普适性。



1. 一种降低光漂白的超分辨显微方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 引入两束激光,对其进行功率和偏振调控,实现双光束照明;

S2. 通过相位调制器件,对两束激光进行空间强度调制;

S3. 通过时间调制器件,对两束激光进行时间调制,并且优化其调制对比度;

S4. 通过光学锁相探测,将信号从空间域移到频域,解调所需信号;

S5. 获取最佳照明光强,对样品产生荧光激发,实现低光漂白的超分辨成像;

所述的功率和偏振调控包括以下步骤:

S101. 调节其中一束激光,使其为低功率激光,其功率为 I_s ,将其偏振情况,调整为垂直偏振光;

S102. 调节另一束激光,使其为高功率激光,其功率为 I_d ,将其偏振情况,调整为水平偏振光;

S103. 将两束激光合束,并通过偏振片将其调整为圆偏光,照射至样品面上;

所述的空间强度调制是将高功率激光通过相位调制器件将波前调制为涡旋光;

所述的时间调制是对两束激光分别加载正弦波调制 f_1 、 f_2 ,使其光强随时间周期性变化;

所述的调制对比度为 $CM = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$,其中 I_{min} 是激发光或损耗光的光强最小值, I_{max} 是激发光或损耗光的光强最大值;两束激光所加载调制对比度各不相同,分别为 CM_1 和 CM_2 ,其中 CM_1 对应正弦波调制 f_1 和 CM_2 对应正弦波调制 f_2 ;

所述的光学锁相探测包括以下步骤:

S401. 将 $I_s, I_d, f_1, f_2, CM_1, CM_2$ 视为自变量,计算荧光强度 I_{fluor} ;

S402. 将荧光强度 I_{fluor} 通过傅里叶变换,转到频域,获得各个频率分量下的值;

S403. 对各个频率分量下的值进行差分处理;

S404. 通过傅里叶逆变换,将差分的结果转到空域,获得低背景噪声的荧光量 I'_{fluor} 。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,在S404中还获得相应的分辨率提升的成像半高全宽FWHM。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,还包括采用梯度下降法计算 $\argmin_{I_d} FWHM$,获得在成像半高全宽FWHM最小的情况下, I_d 的值无需过大,以实现降低光漂白的效果。

一种降低光漂白的超分辨显微方法

技术领域

[0001] 本发明属于超分辨显微成像领域,涉及一种降低光漂白的超分辨显微方法。

背景技术

[0002] 由于光学系统衍射的影响,常规远场光学显微方法可实现的分辨率存在限制。根据阿贝衍射极限理论,光束经显微物镜聚焦后所成光斑的尺寸用半高全宽表示为 $\Delta r = \frac{\lambda}{2NA}$,其中 λ 为显微镜的工作波长, NA 为所用显微物镜的数值孔径。因此,常规远场光学显微镜的极限分辨率一般被限制在了半波长左右。

[0003] 为了突破光学衍射极限的限制,提高显微系统的分辨率,科研工作者们提出了多种超分辨光学显微方法,其中荧光激发受到了很大的关注。近二十年来,越来越多的研究人员致力于光学纳米分辨显微技术的发展。其中最典型代表就是Stefan Hell于1994年提出的受激辐射损耗显微术(STED)。目前,STED已在生物或细胞结构上,如细胞膜、囊泡、内吞体、病毒等显微结构上有了成功的应用,且解决了许多困扰生命科学家多年的疑难问题。作为第一个真正获得广泛认可的远场超分辨显微技术,STED已经取得了长足的进步,在空间分辨率、敏感度、时间分辨率、成像深度等方面取得了前所未有的突破。此外,在STED研究的基础上,产生了许多基于双光束照明的衍生超分辨成像技术,如饱和吸收竞争成像、基态损耗显微、可逆饱和光学线性荧光跃迁显微等。

[0004] 以上超分辨显微技术由所加载的抑制光的光功率决定。而实际操作中,不能无限地提升抑制光功率,因为这对荧光样品会产生严重光漂白与光损伤作用,使得可观测时间大大缩短,不利于长时程生物成像。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种降低光漂白的超分辨显微方法。

[0006] 本发明方法具体是:

[0007] S1. 引入两束激光,对其进行功率和偏振调控,实现双光束照明;

[0008] S2. 通过相位调制器件,对两束激光进行空间强度调制;

[0009] S3. 通过时间调制器件,对两束激光进行时间调制,并且优化其调制对比度;

[0010] S4. 通过光学锁相探测,将信号从空间域移到频域,解调所需信号;

[0011] S5. 获取最佳照明光强,对样品产生荧光激发,实现低光漂白的超分辨成像。

[0012] 相对于现有技术,本发明具有以下有益的技术效果:

[0013] (1) 无需高功率照明,可实现同样分辨率的成像;

[0014] (2) 以算法替代硬件,降低装置复杂性,节约成本;此外无需锁相放大器也使得探测器的选择可以多样化,可以采用暗计数较低的雪崩探测器(APD),实现更高的信噪比成像;

[0015] (3) 应用普适性强,可拓展至基于双光束照明的超分辨成像装置中。

附图说明

- [0016] 图1为本实施例的工作流程图；
- [0017] 图2为本实施例的用于降低光漂白的受激辐射损耗超分辨显微装置的光路示意图；
- [0018] 图3本实施例中调制对比度定义的示意图；
- [0019] 图4为实施例中不同调制对比度下损耗光光强与成像半高全宽的对应关系；
- [0020] 图5为本实施例中采用降低光漂白方法后STED的细胞成像图(右)与传统STED(左)对比。

具体实施方式

- [0021] 以下结合附图对本申请作进一步详细说明。
- [0022] 如图1所示,本申请实施例的一种降低光漂白的超分辨显微方法,包括以下步骤:
- [0023] S1. 引入两束激光,对其进行功率和偏振调控,实现双光束照明;
- [0024] S2. 通过相位调制器件,对两束激光进行空间强度调制;
- [0025] S3. 通过时间调制器件,对两束激光进行时间调制,并且优化其调制对比度;
- [0026] S4. 通过光学锁相探测技术,将信号从空间域移到频域,解调所需信号;
- [0027] S5. 获取最佳照明光强,对样品产生荧光激发,实现低光漂白的超分辨成像。
- [0028] 依据上述记载,本申请实施例可以有效缓解成像过程中产生的光漂白现象。在照明端,通过双光束照明,并且对其均加载调制信号,使其调制对比度可调;在探测端,采用光学锁相探测技术,将信号从空间域转到频域,解调所需信号。通过最佳配比调制对比度,可获得较低的照明光功率,大大降低光漂白的影响。
- [0029] 进一步地,步骤S1中,所述的功率和偏振调控包括以下步骤:
- [0030] S101. 调节其中一束激光,使其为低功率激光,其功率为 I_s ,将其偏振情况,调整为垂直偏振光。
- [0031] S102. 调节另一束激光,使其为高功率激光,其功率为 I_d ,将其偏振情况,调整为水平偏振光。
- [0032] S103. 将两束激光合束,并通过偏振片将其调整为圆偏光,照射至样品面上。
- [0033] 进一步地,步骤S2中,所述的空间强度调制是将高功率激光通过相位调制器件将波前调制为涡旋光。
- [0034] 进一步地,步骤S3中,所述的时间调制是对两束激光分别加载正弦波调制 f_1 和 f_2 ,使其光强随时间周期性变化。
- [0035] 进一步地,步骤S3中,所述的调制对比度为 $CM = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$,其中 I_{max} 和 I_{min} 分别是激发光或损耗光的光强最小值和光强最大值;并且两束光所加载调制对比度各不相同,分别为CM1(对应 f_1)和CM2(对应 f_2)。
- [0036] 进一步地,步骤S4中,所述的光学锁相探测技术包括以下步骤:
- [0037] S401. 自变量为 $I_s, I_d, f_1, f_2, CM_1, CM_2$, 计算荧光强度 I_{fluor} 。
- [0038] S402. 将 I_{fluor} 通过傅里叶变换,转到频域,获得各个频率分量下的值,包括 $\xi(f_1)$, $\xi(f_2)$, $\xi(f_1 + f_2)$, $\xi(f_1 - f_2)$ 等。
- [0039] S403. 通过差分处理,如 $\xi(f_1) - \xi(f_1 + f_2)$, $\xi(f_1) - \xi(f_2)$ 或 $\xi(f_1) - \xi(f_1 - f_2)$ 。

[0040] S404. 通过傅里叶逆变换,将差分的结果转到空域,获得低背景噪声和分辨率提升的荧光量 I'_{fluor} ,并获得相应的成像半高全宽FWHM。

[0041] 进一步地,步骤S4中,所述的光学锁相探测技术还可以采用梯度下降法计算 $\text{argmin}_{I_d} \text{FWHM}$,获得在FWHM最小的情况下, I_d 的值可以不用过大,以实现降低光漂白的效果。

[0042] 如图2所示,本实施例还提供了一种基于受激辐射损耗的超分辨显微装置,包括:低功率激光器1,第一单模光纤2,第一准直透镜3,第一反射镜4、第二反射镜5, $\lambda/2$ 波片6,第一偏振分束器7,第三反射镜8、第四反射镜9,第二偏振分束器10,第一二色镜11,高功率激光器 12,第二单模光纤13,第二准直透镜14,格兰棱镜15, $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板16,第一 $\lambda/4$ 波片17,第二二色镜18,介质反射镜19,第二 $\lambda/4$ 波片20,扫描振镜21,反射镜22,扫描透镜23,场镜24,物镜25,样品台26,带通滤波片27,聚焦透镜28,针孔29,多模光纤30,雪崩探测器31,声光调制器32,射频驱动器33,第一信号发生器34,电光调制器35,第二信号发生器36,主机37。

[0043] 其中,第一单模光纤2,第一准直透镜3,第一反射镜4、第二反射镜5, $\lambda/2$ 波片6,第一偏振分束器7,第三反射镜8,声光调制器32,第四反射镜9,第二偏振分束器10,依次位于低功率激光器1出射光束的光轴之上;第二单模光纤13,第二准直透镜14,格兰棱镜15, $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板16,第一 $\lambda/4$ 波片17,依次位于高功率激光器12出射光束的光轴之上。

[0044] 其中,二色镜18位于经 $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板16调制后光束的光轴之上。

[0045] 其中,带通滤波片20,扫描振镜21依次位于经介质反射镜19偏折之后的光轴之上。

[0046] 其中,扫描透镜23,场镜24,显微物镜25,样品台26依次位于扫描振镜21出射光束的光轴之上。

[0047] 其中,带通滤波片27,聚焦透镜28,针孔29,多模光纤30,雪崩探测器31依次位于经二色镜11后透射光束的光轴之上;所述针孔29位于聚焦透镜28的焦平面处。

[0048] 其中,控制器(图中未展示)与扫描振镜21相连,用于加载控制扫描振镜21的扫描。

[0049] 上述装置中,显微物镜25的数值孔径 $NA=1.4$;所用针孔29的直径为0.6个艾里斑直径。

[0050] 采用图2所示的装置实现降低光漂白的的方法如下:

[0051] 待测样品所出射的信号光被显微物镜25收集,之后依次通过场镜24、扫描透镜23、反射镜22、扫描振镜21、介质反射镜19、二色镜18,透过二色镜11。信号光束通过带通滤波片27滤去杂散光,之后经聚焦透镜28聚焦并通过针孔29进行空间滤波,最终被雪崩探测器31接收。

[0052] 信号发生器34的输出频率为 f_1 时,经过调制后的光束经显微镜聚焦在样品上形成一个脉冲频率为 f_1 的实心光斑,其光强为 I_s 。该实心光斑的尺寸与常规光学显微术中所用照明光束聚焦所成衍射斑的尺寸相同。信号发生器36的输出频率为 f_2 ,当 $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板的调制函数为 $f(\rho, \varphi) = \varphi$ 时,由德拜积分计算可得,调制后光束经显微物镜聚焦后在样品上所成光斑为一个脉冲频率为 f_2 的环形光斑,其光强为 I_d 。所加载的正弦频率函数, $f_1(t)$ 和 $f_2(t)$,可表示如下:

[0053] $f_1(t) = I + CM_1 \cos(2\pi f_1 t)$

[0054] $f_2(t) = I + CM_2 \cos(2\pi f_2 t)$

[0055] 通过信号发生器实时调控环形光斑的调制对比度,定义调制对比度为 $CM = (I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min})$, 其中 $I_{\max}$ 和 $I_{\min}$ 分别是激发光或损耗光的光强最小值和光强最大值。实心光斑和环形光斑的调制对比度分别为 CM_1 和 CM_2 (如图3所示)。

[0056] 通过以上参数,基于分子能级公式,可以计算荧光强度 I_{fluor} ; 将 I_{fluor} 通过傅里叶变换,转到频域,获得各个频率分量下的值,包括 $\xi(f_1)$, $\xi(f_2)$, $\xi(f_1 + f_2)$, $\xi(f_1 - f_2)$ 等。通过差分处理,如 $\xi(f_1) - \xi(f_1 + f_2)$, $\xi(f_1) - \xi(f_2)$ 或 $\xi(f_1) - \xi(f_1 - f_2)$, 将获得的值经过傅里叶逆变换转到空域,可得到低背景噪声的荧光量 I'_{fluor} , 并获得相应的分辨率提升的成像半高全宽 FWHM。采用梯度下降法计算 $\argmin_{I_d} FWHM$, 获得在 FWHM 最小的情况下, I_d 的值无需过大,以实现降低光漂白的效果。

[0057] 通过调节两束激光的调制对比度,可有效降低所需的损耗光强。图4为在不同调制对比度情况下,所需损耗光光强与获得的成像分辨率(半高全宽)之间的关系。由图可知,在 $40\text{MW}/\text{cm}^2$ 的光强下,可获得40纳米的分辨率;而在传统STED中,需要 $100\text{MW}/\text{cm}^2$ 的光强才能得到40纳米的分辨率,照明光强只需要原先的40%。本申请可有效降低损耗光强,从而降低光漂白作用。图5是对比实验,图5中左边是传统STED对生物样品长时间照射后的情况,其中心照射区域($50\text{微米} \times 50\text{微米}$)已经没有荧光信号;图5中右边是采用本方法的结果,其中心照射区域仍然可以发射荧光。

[0058] 术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。

[0059] 以上描述仅为本申请的较佳实施例以及对所运用技术原理的说明。本领域技术人员应当理解,本申请中所涉及的应用范围,并不限于上述技术特征的特定组合而成的技术方案,同时也应涵盖在不脱离前述申请构思的情况下,由上述技术特征或其等同特征进行任意组合而形成的其它技术方案。例如上述特征与本申请中申请的(但不限于)具有类似功能的技术特征进行互相替换而形成的技术方案。

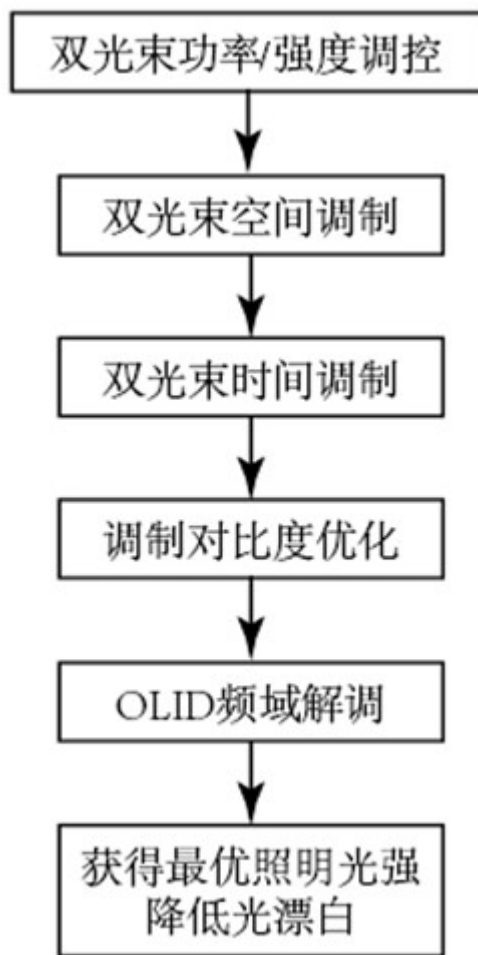


图 1

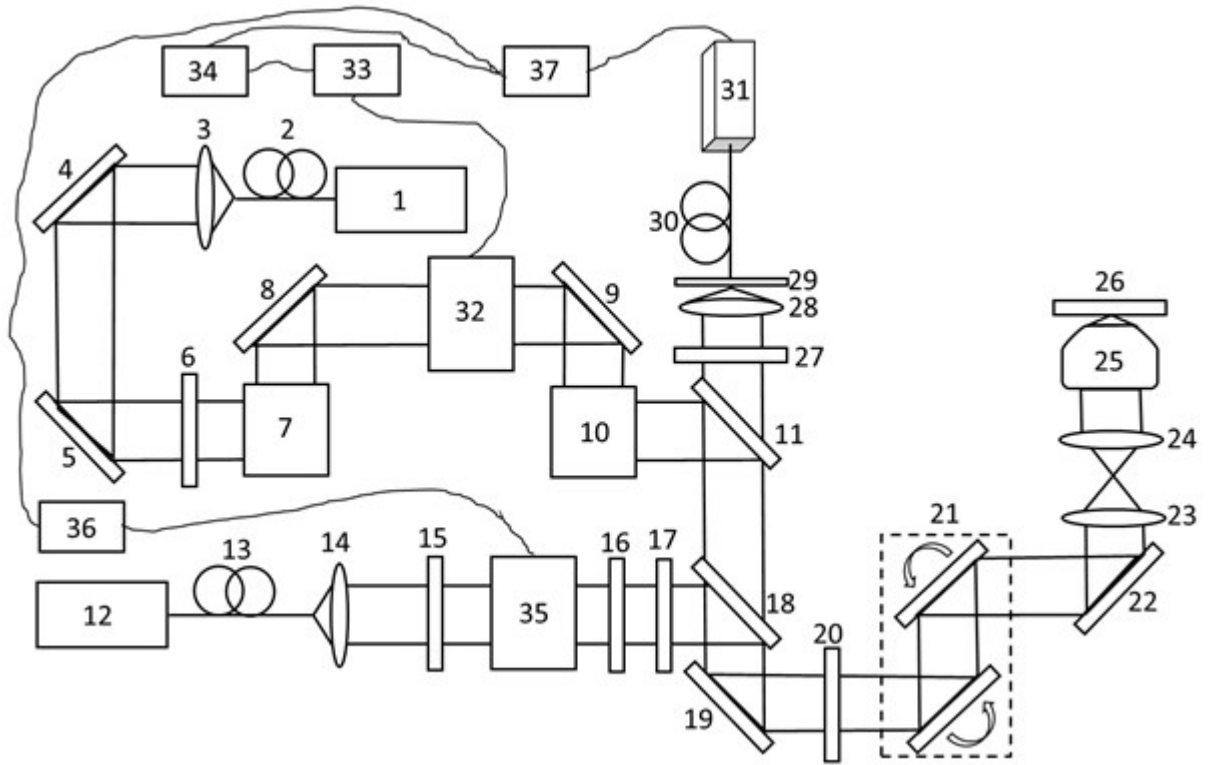


图 2

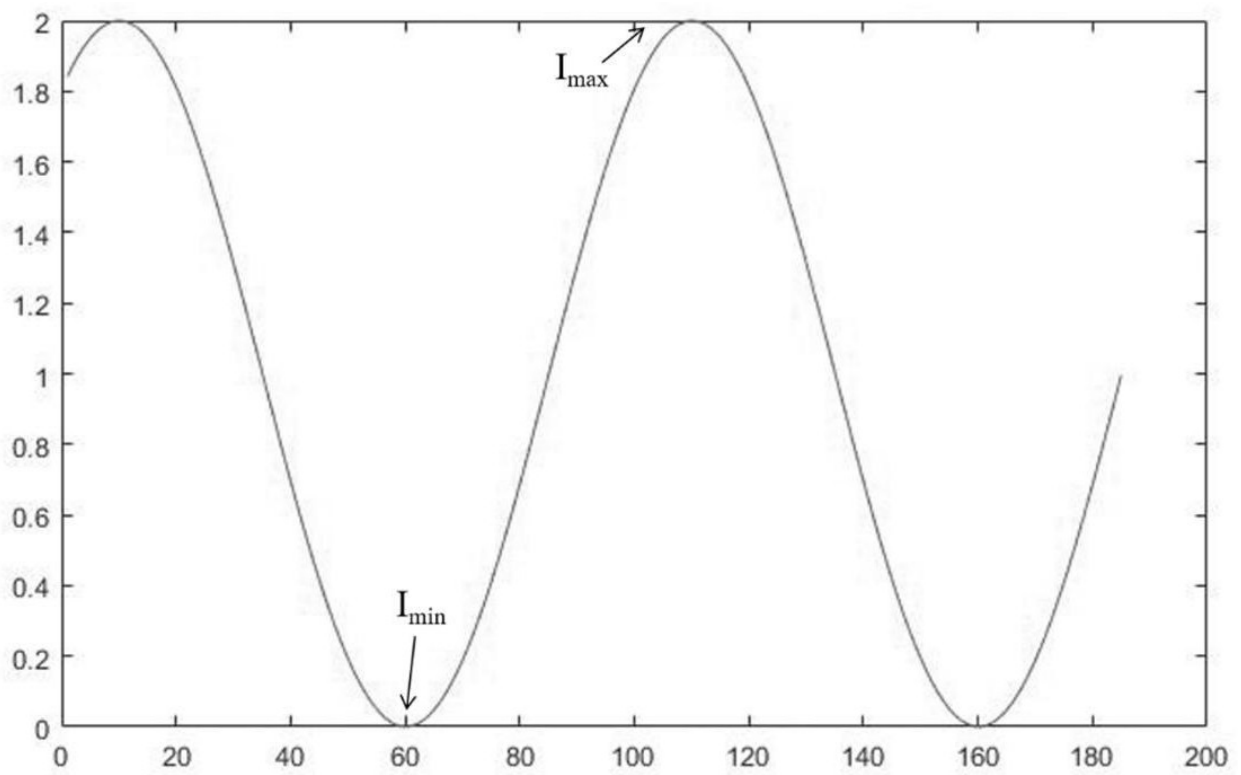


图 3

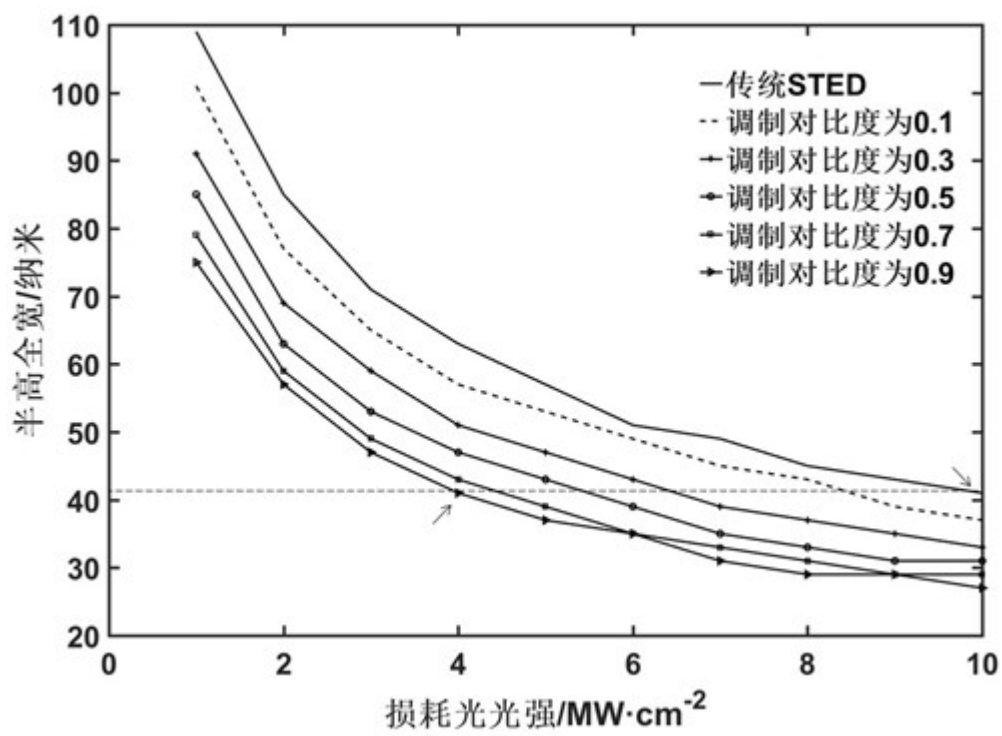


图 4

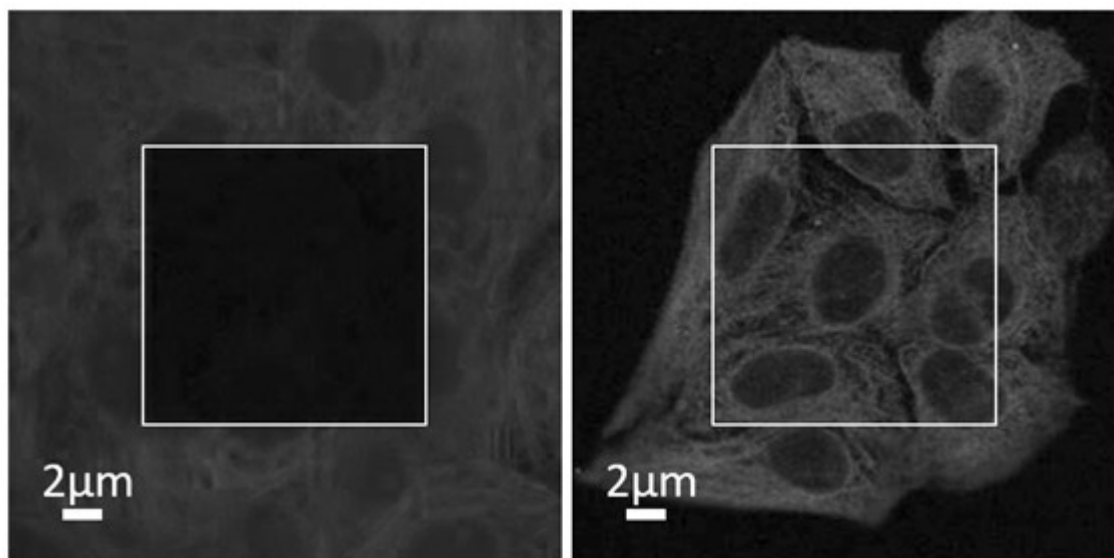


图 5