

(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
2019 年 6 月 27 日 (27.06.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/119458 A1

(51) 国际专利分类号:
G02B 27/58 (2006.01) *G02B 21/00* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) *G06N 3/12* (2006.01)
G02B 26/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/118137

(22) 国际申请日: 2017 年 12 月 23 日 (23.12.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(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: 严伟(YAN, Wei); 中国广东省深圳市南
山区南海大道3688号, Guangdong 518060 (CN)。
屈军乐(QU, Junle); 中国广东省深圳市南山区
南海大道3688号, Guangdong 518060 (CN)。 王

璐玮(WANG, Luwei); 中国广东省深圳市南山区
南海大道3688号, Guangdong 518060 (CN)。 叶
彤(YE, Tong); 中国广东省深圳市南山区南海
大道3688号, Guangdong 518060 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市恒申知识产权事务所(普通合
伙)(HENSEN INTELLECTUAL PROPERTY FIRM);
中国广东省深圳市福田区南园路68号上步
大厦10H, Guangdong 518000 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: SUPER RESOLUTION IMAGING SYSTEM

(54) 发明名称: 超分辨成像系统

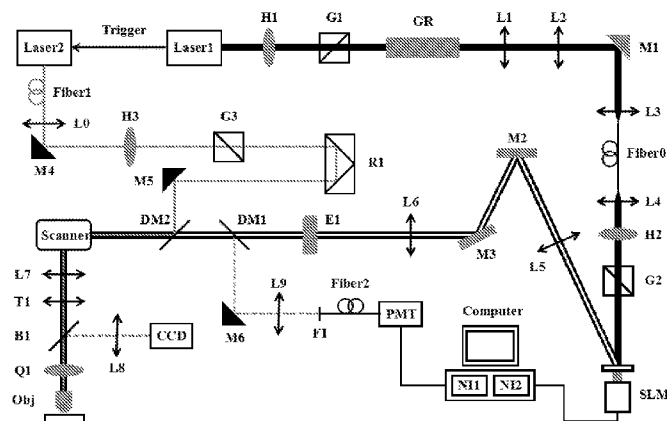


图 1

(57) Abstract: A super resolution imaging system, comprising a femtosecond laser (Laser1), a picosecond laser (Laser2), a first data collection card (NI1), a second data collection card (NI2), a spatial light modulator (SLM), etc. After the dissipation light generated by the femtosecond laser (Laser1) and the excitation light generated by the picosecond laser (Laser2) are emitted into a sample, a fluorescent signal is generated; the second data collection card (NI2) converts the fluorescence signal into voltage information; the voltage information acts as a fitness value of a genetic algorithm, and the voltage information is calculated according to the genetic algorithm so as to obtain the maximum voltage absolute value; and a phase diagram corresponding to the maximum voltage absolute value acts as a phase compensation diagram, and the phase compensation diagram is superposed on the dissipation light to perform aberration correction on the dissipation light. By means of the present invention, the aberration introduced in an STED imaging process can be overcome, the imaging depth and the spatial resolution of the STED super resolution imaging system can be improved, and thus the super resolution imaging system can be widely applied in biomedicine and other fields.

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, ST, 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)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 一种超分辨成像系统, 包括飞秒激光器 (Laser1)、皮秒激光器 (Laser2)、第一数据采集卡 (NI1)、第二数据采集卡 (NI2)、空间光调制器 (SLM) 等, 飞秒激光器 (Laser1) 产生的耗散光与皮秒激光器 (Laser2) 产生的激发光射入样本后, 会产生荧光信号, 第二数据采集卡 (NI2) 将荧光信号转换为电压信息, 电压信息作为遗传算法中的适应度值, 根据遗传算法对电压信息进行计算, 得到一个最大电压绝对值, 并将与最大电压绝对值对应的相位图作为相位补偿图, 通过将相位补偿图叠加到耗散光上, 对耗散光进行像差校正, 克服STED成像过程中引入的像差, 提高STED超分辨成像系统的成像深度和空间分辨率, 使得可以在生物医学等方面得到广泛应用。

超分辨成像系统

技术领域

本发明涉及光学显微成像领域，尤其涉及一种超分辨成像系统。

背景技术

在光学系统中，如果从物点发出的所有光线经过受激发射损耗(synchronous transition equivalent decomposition, STED)超分辨成像系统都聚焦于一点，则称此点为物点的完善像，如果物点在垂直平面上移动时，其完善像也在垂直平面上作线性运动，此STED超分辨成像系统是理想的STED超分辨成像系统。但是，STED超分辨成像系统中通常包含许多光学原件，如包含许多透镜、玻片、二向色镜和反射镜等光学原件，而且人工搭建的STED超分辨成像系统无法做到对光线的精准控制，同时生物样品存在表面不平整性和内部折射率分布的非均匀性特点，这些因素都会给STED超分辨成像系统带来像差，降低STED超分辨成像系统的成像深度和空间分辨率，影响成像质量，限制了其在生物医学等方面的应用。

因此，现有的STED超分辨成像系统，存在着由于包含许多光学原件、生物样品存在表面不平整性及内部折射率分布的非均匀性特点等因素，会给STED超分辨成像系统带来像差，降低STED超分辨成像系统的成像深度和空间分辨率，影响成像质量，限制了其在生物医学等方面的应用的技术问题。

发明内容

本发明的主要目的在于提供一种超分辨成像系统，旨在解决现有的STED超分辨成像系统，存在的由于包含许多光学原件、生物样品存在表面不平整性

及内部折射率分布的非均匀性特点等因素，会给 STED 超分辨成像系统带来像差，降低 STED 超分辨成像系统的成像深度和空间分辨率，影响成像质量，限制了其在生物医学等方面的应用的技术问题。

为实现上述目的，本发明提供一种超分辨成像系统，所述系统包括：飞秒激光器，用于产生耗散光，并入射至第一光调制装置；

所述第一光调制装置，设置在所述飞秒激光器的出射光路上，用于调制所述耗散光的偏振特性及强度；

玻璃棒，设置在所述第一光调制装置的出射光路上，用于对经过调制后的耗散光进行脉冲宽度展宽处理，使得所述耗散光的脉冲宽度为 1 皮秒；

第一透镜组，设置在所述玻璃棒的出射光路上，用于对脉冲宽度为 1 皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理；

第一透镜，设置在所述第一透镜组的出射光路上，用于将光斑直径扩大的耗散光聚焦耦合至 100 米单模保偏光纤；

所述 100 米单模保偏光纤，设置在所述第一透镜的出射光路上，用于将脉冲宽度为 1 皮秒的耗散光的脉冲宽度展宽至 200 皮秒；

第二透镜，设置在所述 100 米单模保偏光纤的出射光路上，用于对脉冲宽度为 200 皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理，并入射至第二光调制装置；

所述第二光调制装置，设置在所述第二透镜的出射光路上，用于调制所述耗散光的偏振特性及强度；

所述空间光调制器，设置在所述第二光调制装置的出射光路上，将从所述第二光调制装置射出的耗散光反射至第二透镜组；

所述第二透镜组，用于对射入的耗散光的光斑直径进行缩小处理，并将光斑直径进行缩小处理的耗散光射入振镜扫描系统；

皮秒激光器，用于产生激发光，并入射至第一单模光纤；

所述第一单模光纤，设置在所述皮秒激光器的出射光路上，用于对射入的

激发光进行模式调控;

第三透镜, 设置在所述第一单模光纤的出射光路上, 用于对进行模式调控后的激发光的光斑直径进行扩大处理, 并入射至第三光调制装置;

所述第三光调制装置, 用于调制所述激发光的偏振特性及强度;

角反射器, 设置在所述第三光调制装置的出射光路上, 用于改变所述激发光所在的光路的光程, 在时间上控制所述激发光及所述耗散光之间的脉冲间隔, 并将所述激发光射入所述振镜扫描系统;

所述振镜扫描系统, 用于对重叠的激发光及耗散光进行同步面阵扫描;

四分之一玻片, 用于对经过所述振镜扫描系统扫描后的激发光及耗散光进行偏振处理, 将所述激发光及所述耗散光由线偏振光调制成圆偏振光;

高数值孔径物镜, 用于聚焦重叠的激发光及耗散光, 将聚焦后的重叠的激发光及耗散光投射到样品上, 同时收集所述样品反射回来的荧光信号;

滤镜, 用于对所述荧光信号进行过滤, 将预设波段的荧光信号射入第二单模光纤, 并过滤掉所述预设波段以外的荧光信号;

第二单模光纤, 用于将经过所述滤镜过滤后得到的荧光信号传输给光电倍增管;

所述光电倍增管, 用于将经过所述滤镜过滤后得到的荧光信号进行放大;

第一数据采集卡, 用于采集和分析所述光电倍增管收集到的荧光信号;

第二数据采集卡, 用于将所述光电倍增管收集到的荧光信号转换为电压信息, 所述电压信息作为遗传算法中的适应度值, 根据遗传算法对所述电压信息进行计算, 得到一个最大电压绝对值, 并将与最大电压绝对值对应的相位图作为相位补偿图;

所述空间光调制器用于将所述相位补偿图叠加到所述耗散光上, 对所述耗散光进行像差校正; 还用于在所述空间光调制器的液晶面上加载所述耗散光的螺旋相位信息, 将所述耗散光由高斯型光转化成环形光。

可选的,所述皮秒激光器通过外接线与所述飞秒激光器相连接,所述皮秒激光器由所述飞秒激光器触发输出所述激发光。

可选的,所述第一光调制装置包括第一半波片及第一格兰激光棱镜,所述第二光调制装置包括第二半波片及第二格兰激光棱镜,所述第三光调制装置包括第三半波片及第三格兰激光棱镜;

所述第一半波片,设置在所述飞秒激光器的出射光路上,用于调制从所述飞秒激光器射出的耗散光的偏振特性;

所述第一格兰激光棱镜,设置在所述第一半波片的出射光路上,用于对调制后的耗散光的强度进行调整;

所述第二半波片,用于调制从所述第二透镜射出的耗散光的偏振特性;

所述第二格兰激光棱镜,设置在所述第二半波片的出射光路上,用于对射入的调制后的耗散光的强度进行调整;

所述第三半波片,用于调制从所述第一单模光纤射出的激发光的偏振特性;

所述第三格兰激光棱镜,设置在所述第三波片的出射光路上,用于对射入的调制后的激发光的强度进行调整。

可选的,所述高数值孔径物镜的放大倍率为 100 倍,数值孔径为 1.4。

可选的,所述系统还包括:分束器及电荷耦合元件;

所述分束器,用于将所述高数值孔径物镜收集并射出的荧光信号分成两部分,一部分反射后进入所述电荷耦合元件,另一部分透射进入所述滤镜;

所述电荷耦合元件,用于实时监测射入的荧光信号中的耗散光的光斑和激发光的光斑的重叠情况。

可选的,所述系统还包括:第一二向色镜及第二二向色镜;

所述第一二向色镜,用于透射从所述第二透镜组射出的耗散光,并反射所述荧光信号;

所述第二二向色镜,用于反射从所述角反射器射出的激发光,并透射所述

荧光信号。

可选的，所述第二二向色镜，还用于调整所述荧光信号中的耗散光的传输方向及激发光的传输方向，使所述荧光信号中的所述耗散光及所述激发光重叠。

可选的，所述分束器将所述荧光信号按照 9:1 分成两部分。

可选的，所述耗散光和所述激发光的脉冲峰值之间的间隔为 160~200ps。

可选的，所述系统还包括电控挡板，当所述电控挡板闭合时，挡住从所述第二透镜组射出的耗散光。

本发明提供一种超分辨成像系统，包括飞秒激光器、皮秒激光器、第一数据采集卡、第二数据采集卡、空间光调制器等，飞秒激光器产生的耗散光与皮秒激光器产生的激发光射入样本后，会产生荧光信号，第二数据采集卡将荧光信号转换为电压信息，该电压信息作为遗传算法中的适应度值，根据遗传算法对电压信息进行计算，得到一个最大电压绝对值，并将与最大电压绝对值对应的相位图作为相位补偿图，通过将相位补偿图叠加到耗散光上，对耗散光进行像差校正。与现有技术相比，本发明实施例在 STED 超分辨成像系统中引入遗传算法的像差校正系统，根据遗传算法得到相位补偿图，通过将相位补偿图叠加到耗散光上，对耗散光进行像差校正，克服 STED 成像过程中引入的像差，提高 STED 超分辨成像系统的成像深度和空间分辨率，使得可以在物医学等方面得到广泛应用。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图1为本发明第一实施例提供的一种超分辨成像系统的结构示意图；

图2为对高斯型耗散光进行像差校正的待加载在空间光调制器SLM上的相位补偿图；

图3为加载在空间光调制器SLM上的耗散光的螺旋相位信息示意图；

图4为将相位补偿图与螺旋相位信息叠加后的具有像差校正效果的环形光示意图；

图5为耗尽光与激发光重叠后超越衍射极限的示意图；

图6(a)为无像差校正时的荧光珠的共聚焦成像示意图；

图6(b)为荧光珠的受激发射损耗STED超分辨成像示意图。

具体实施方式

为使得本发明的发明目的、特征、优点能够更加的明显和易懂，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而非全部实施例。基于本发明中的实施例，本领域技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

为了说明本发明的技术方案，下面通过具体实施例来进行说明。

请参阅图1，图1为本发明第一实施例提供一种超分辨成像系统的结构示意图，包括：飞秒激光器 Laser1，用于产生耗散光，并入射至第一光调制装置；

第一光调制装置，设置在飞秒激光器 Laser1 的出射光路上，用于调制耗散光的偏振特性及强度；

玻璃棒 GR，设置在第一光调制装置的出射光路上，用于对经过调制后的耗散光进行脉冲宽度展宽处理，使得耗散光的脉冲宽度为 1 皮秒；

第一透镜组，设置在玻璃棒 GR 的出射光路上，用于对脉冲宽度为 1 皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理；

第一透镜 L3, 设置在第一透镜组的出射光路上, 用于将光斑直径扩大的耗散光聚焦耦合至 100 米单模保偏光纤 Fiber0;

100 米单模保偏光纤 Fiber0, 设置在第一透镜 L3 的出射光路上, 用于将脉冲宽度为 1 皮秒的耗散光的脉冲宽度展宽至 200 皮秒;

第二透镜 L4, 设置在 100 米单模保偏光纤 Fiber0 的出射光路上, 用于对脉冲宽度为 200 皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理, 并入射至第二光调制装置;

第二光调制装置, 设置在第二透镜 L4 的出射光路上, 用于调制耗散光的偏振特性及强度;

空间光调制器 SLM, 设置在第二光调制装置的出射光路上, 将从第二光调制装置射出的耗散光反射至第二透镜组;

第二透镜组, 用于对射入的耗散光的光斑直径进行缩小处理, 并将光斑直径进行缩小处理的耗散光射入振镜扫描系统 Scanner;

皮秒激光器 Laser2, 用于产生激发光, 并入射至第一单模光纤 Fiber1;

第一单模光纤 Fiber1, 设置在皮秒激光器 Laser2 的出射光路上, 用于对射入的激发光进行模式调控;

第三透镜, 设置在第一单模光纤 Fiber1 的出射光路上, 用于对进行模式调控后的激发光的光斑直径进行扩大处理, 并入射至第三光调制装置;

第三光调制装置, 用于调制激发光的偏振特性及强度;

角反射器 R1, 设置在第三光调制装置的出射光路上, 用于改变激发光所在的光路的光程, 在时间上控制激发光及耗散光之间的脉冲间隔, 并将激发光射入振镜扫描系统 Scanner;

振镜扫描系统 Scanner, 用于对重叠的激发光及耗散光进行同步面阵扫描;

四分之一玻片 Q1, 用于对经过振镜扫描系统 Scanner 扫描后的激发光及耗散光进行偏振处理, 将激发光及耗散光由线偏振光调制成圆偏振光;

高数值孔径物镜 Obj, 用于聚焦重叠的激发光及耗散光, 将聚焦后的重叠的激发光及耗散光投射到样品上, 同时收集样品反射回来的荧光信号;

滤镜 F1, 用于对荧光信号进行过滤, 将预设波段的荧光信号射入第二单模光纤 Fiber2, 并过滤掉预设波段以外的荧光信号;

第二单模光纤 Fiber2, 用于将经过滤镜 F1 过滤后得到的荧光信号传输给光电倍增管 PMT;

光电倍增管 PMT, 用于将经过滤镜 F1 过滤后得到的荧光信号进行放大;

第一数据采集卡 NI1, 用于采集和分析光电倍增管 PMT 收集到的荧光信号;

第二数据采集卡 NI2, 用于将光电倍增管 PMT 收集到的荧光信号转换为电压信息, 电压信息作为遗传算法中的适应度值, 根据遗传算法对电压信息进行计算, 得到一个最大电压绝对值, 并将与最大电压绝对值对应的相位图作为相位补偿图;

空间光调制器 SLM 用于将相位补偿图叠加到耗散光上, 对耗散光进行像差校正; 还用于在空间光调制器 SLM 的液晶面上加载耗散光的螺旋相位信息, 将耗散光由高斯型光转化成环形光。

进一步的, 皮秒激光器 Laser2 通过外接线与飞秒激光器 Laser1 相连接, 皮秒激光器 Laser2 由飞秒激光器 Laser1 触发输出激发光。

进一步的, 第一光调制装置包括第一半波片 H1 及第一格兰激光棱镜 G1, 第二光调制装置包括第二半波片 H2 及第二格兰激光棱镜 G2, 第三光调制装置包括第三半波片 H3 及第三格兰激光棱镜 G3;

第一半波片 H1, 设置在飞秒激光器 Laser1 的出射光路上, 用于调制从飞秒激光器 Laser1 射出的耗散光的偏振特性;

第一格兰激光棱镜 G1, 设置在第一半波片 H1 的出射光路上, 用于对调制后的耗散光的强度进行调整;

第二半波片 H2, 用于调制从第二透镜射出的耗散光的偏振特性;

第二格兰激光棱镜 G2, 设置在第二半波片 H2 的出射光路上, 用于对射入的调制后的耗散光的强度进行调整;

第三半波片 H3, 用于调制从第一单模光纤 Fiber1 射出的激发光的偏振特性;

第三格兰激光棱镜 G3, 设置在第三波片的出射光路上, 用于对射入的调制后的激发光的强度进行调整。

进一步的, 高数值孔径物镜 Obj 的放大倍率为 100 倍, 数值孔径为 1.4。

进一步的, 系统还包括: 分束器 B1 及电荷耦合元件 CCD;

分束器 B1, 用于将高数值孔径物镜 Obj 收集并射出的荧光信号分成两部分, 一部分反射后进入电荷耦合元件 CCD, 另一部分透射进入滤镜 F1;

电荷耦合元件 CCD, 用于实时监测射入的荧光信号中的耗散光的光斑和激发光的光斑的重叠情况。

进一步的, 系统还包括: 第一二向色镜 DM1 及第二二向色镜 DM2;

第一二向色镜 DM1, 用于透射从第二透镜组射出的耗散光, 并反射荧光信号;

第二二向色镜 DM2, 用于反射从角反射器 R1 射出的激发光, 并透射荧光信号。

进一步的, 第二二向色镜 DM2, 还用于调整荧光信号中的耗散光的传输方向及激发光的传输方向, 使荧光信号中的耗散光及激发光重叠。

进一步的, 分束器 B1 将荧光信号按照 9:1 分成两部分。

进一步的, 耗散光和激发光的脉冲峰值之间的间隔为 160~200ps。

进一步的, 系统还包括电控挡板 E1, 当电控挡板 E1 闭合时, 挡住从第二透镜组射出的耗散光。

在本发明实施例中, 如图 1 所示, 本系统有两束激光, 分别为飞秒激光器 Laser1 产生的波长为 780nm 的耗散光和皮秒激光器 Laser2 产生的波长为 635nm

的激发光。工作时，先打开皮秒激光器 Laser2 产生激发光，后打开飞秒激光器 Laser1 产生耗散光，常用手段是利用飞秒激光器 Laser1 的控制系统来同步触发 Trigger 飞秒激光器 Laser1 产生耗散光及皮秒激光器 Laser2 产生激发光，下面详细介绍耗散光及激发光的光路，具体的：

耗散光的光路为：耗散光首先通过第一光调制装置，第一光调制装置包括第一半波片 H1 及第一格兰激光棱镜 G1，第一半波片 H1 设置在飞秒激光器 Laser1 的出射光路上，用于调制从飞秒激光器 Laser1 射出的耗散光的偏振特性，确保进入光路系统的耗散光为线偏振光，第一格兰激光棱镜 G1 设置在第一半波片 H1 的出射光路上，对调制后变成线偏振光的耗散光的强度进行调整，之后耗散光射入玻璃棒 GR，玻璃棒 GR 设置在第一光调制装置的出射光路上，对射入的经过调制后的耗散光进行脉冲宽度展宽处理，使得耗散光的脉冲宽度为 1 皮秒后，射入第一透镜组，第一透镜组由两个透镜组成，分别是透镜 L1 和透镜 L2，第一透镜组设置在玻璃棒 GR 的出射光路上，对脉冲宽度为 1 皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理，将光斑直径扩大至第一透镜 L3 的孔径大小，第一透镜 L3 对射入的耗散光进行聚焦，并将聚焦后的耗散光耦合进 100 米单模保偏光纤 Fiber0，100 米单模保偏光纤 Fiber0 设置在第一透镜的出射光路上，将脉冲宽度为 1 皮秒的耗散光的脉冲宽度展宽至 200 皮秒，并射入第二透镜 L4，第二透镜 L4 设置在 100 米单模保偏光纤 Fiber0 的出射光路上，第二透镜 L4 对脉冲宽度为 200 皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理，将光斑直径扩大至略小于空间光调制器 SLM 的液晶面的纵向宽度，然后进入第二光调制装置，第二光调制装置包括第二半波片 H2 及第二格兰激光棱镜 G2，利用第二光调制装置再一次调节耗散光的偏振特性和强度，使得耗散光的偏振方向平行于空间光调制器 SLM 的液晶面的长轴，以保证空间光调制器 SLM 对耗散光调制的灵敏度。之后，耗散光以 6° 左右的入射角射入空间光调制器 SLM，空间光调制器 SLM 在这里有两个作用，一是由遗传算法控制产生补偿相位，对耗散光进行像差校

正,二是在空间光调制器 SLM 的液晶面上加载耗散光的螺旋相位信息,将耗散光由高斯型光转化成环形光,空间光调制器 SLM 反射后的耗散光经过第二透镜组,第二透镜组由两个透镜组成,分别是透镜 L5 和透镜 L6,对射入的耗散光的光斑直径进行缩小处理,射入电控挡板 E1,因电控挡板 E1 是打开的,第二透镜组射出的耗散光穿过电控挡板 E1 射入第一二向色镜 DM1,第一二向色镜 DM1 透射从第二透镜组射出的耗散光,并射入第二二向色镜 DM2,第二二向色镜 DM2 透射从第一二向色镜 DM1 射入的耗散光,耗散光进入振镜扫描系统 Scanner。

激发光的光路为:激发光由皮秒激光器 Laser2 产生,射入第一单模光纤 Fiber1,第一单模光纤 Fiber1 对射入的激发光进行模式调控,并将模式调控后的激发光耦合至第三透镜 L0,第三透镜 L0 对进行模式调控后的激发光的光斑直径进行扩大处理,并入射至第三光调制装置,第三光调制装置包括第三半波片 H3 及第三格兰激光棱镜 G3,第三半波片 H3 用于调制从第三透镜 L0 射出的激发光的偏振特性,确保进入光路系统的激发光为线偏振光,第三格兰激光棱镜 G3 设置在第三半波片 H3 的出射光路上,对调制后变成线偏振光的激发光的强度进行调整,之后射入角反射器 R1,角反射器 R1 设置在第三光调制装置的出射光路上,改变激发光所在的光路的光程,在时间上控制激发光及耗散光之间的脉冲间隔,使得激发光在前,耗散光在后,激发光和耗散光之间的脉冲间隔应保持在 160~200ps 之间,这样可以保证耗散光更彻底地将激发光产生的激发态电子以受激辐射的形式返回到基态,其中,具体的脉冲间隔数值可通过实际的超分辨成像效果来确定。激发光从角反射器 R1 射出后,射入第二二向色镜 DM2,第二二向色镜 DM2 反射从角反射器 R1 射出的激发光,激发光射入进入振镜扫描系统 Scanner。

激发光和耗散光都射入振镜扫描系统 Scanner 后,振镜扫描系统 Scanner 对重叠的激发光及耗散光进行同步面阵扫描,之后射入透镜 L7 和镜筒透镜 T1,

对经过振镜扫描系统 Scanner 扫描后的激发光及耗散光的光斑直径进行放大，放大至高数值孔径物镜 Obj 的孔径大小，之后透过分束器 B1 射向四分之一玻片 Q1，四分之一玻片 Q1 对射入的激发光及耗散光进行偏振处理，将激发光及耗散光由线偏振光调制成圆偏振光后，射向高数值孔径物镜 Obj，高数值孔径物镜 Obj 聚焦重叠的激发光及耗散光，将聚焦后的重叠的激发光及耗散光投射到样品上，同时收集样品反射回来的荧光信号。荧光信号经过分束器 B1，分束器 B1 将高数值孔径物镜 Obj 收集并射出的荧光信号分成两部分，一部分反射后进入电荷耦合元件 CCD，另一部分透射进入振镜扫描系统 Scanner，具体的，分束器 B1 将荧光信号按照 9:1 分成两部分，十分之一通过透镜 L8 进入电荷耦合元件 CCD，电荷耦合元件 CCD 实时监测射入的荧光信号中的耗散光的光斑和激发光的光斑的重叠情况，十分之九进入振镜扫描系统 Scanner，并从振镜扫描系统 Scanner 射入第二二向色镜 DM2，第二二向色镜 DM2 透射荧光信号，射入第一二向色镜 DM1，第一二向色镜 DM1 反射射入的荧光信号，并射向透镜 L9，经过透镜 L9 的聚焦，将荧光信号聚焦到滤镜 F1，滤镜 F1 对荧光信号进行过滤，将预设波段的荧光信号射入第二单模光纤 Fiber2，并过滤掉预设波段以外的荧光信号，第二单模光纤 Fiber2 将经过滤镜 F1 过滤后得到的荧光信号传输给光电倍增管 PMT，光电倍增管 PMT 将经过滤镜 F1 过滤后得到的荧光信号进行放大，并将放大后的荧光信号传输至第一数据采集卡 NI1 及第二数据采集卡 NI2，第一数据采集卡 NI1 及第二数据采集卡 NI2 是安装在电脑 Computer 上的，第一数据采集卡 NI1 采集和分析光电倍增管 PMT 收集到的荧光信号，将光电倍增管 PMT 收集到的荧光信号用于成像，第二数据采集卡 NI2 将光电倍增管 PMT 收集到的荧光信号转换为电压信息，该电压信息作为遗传算法中的适应度值，根据遗传算法对电压信息进行计算，得到多个电压绝对值，其中，每一个电压绝对值都对应着一个相位图，用以判断像差校正的效果，并反馈给空间光调制器 SLM。需要注意的是，实验时，空间光调制器 SLM 先不

加螺旋相位信息，只加载由遗传算法生成的相位图，对高斯型耗散光进行相位补偿，随着遗传算法的迭代不断生成新的相位图，因根据遗传算法对电压信息进行计算，得到的多个电压绝对值以逐渐增加的趋势变化，经过一定次数的迭代，会得到一个最大电压绝对值，将与最大电压绝对值对应的相位图作为相位补偿图（如图 2 所示），空间光调制器 SLM 在液晶面上加载耗散光的螺旋相位信息（如图 3 所示），则耗散光由高斯型光转化成环形光，将相位补偿图与螺旋相位信息叠加，就形成具有像差校正效果的环形光（如图 4 所示）。具有像差校正效果的环形光经过第一二向色镜 DM1 和第二二向色镜 DM2 透射，与经过第二二向色镜 DM2 反射之后的高斯型激发光重合，经振镜扫描系统 Scanner 扫描之后照射到样品上，通过光电倍增管 PMT 和第一数据采集卡 NI1 收集和分析反射的荧光信号，进而形成超分辨图像。

在本发明实施例中，如图 1，反射镜 M1、反射镜 M2、反射镜 M3、反射镜 M4、反射镜 M5、反射镜 M6 用来改变光束传输方向。

其中，第二二向色镜 DM2 还用于调整荧光信号中的耗散光的传输方向及激发光的传输方向，使荧光信号中的耗散光及激发光重叠，反射镜 M5 和第二二向色镜 DM2 可以对激发光进行微调，以确保与耗散光在空间上高度重合，如图 5 所示。

其中，高数值孔径物镜 Obj 的放大倍率为 100 倍，数值孔径为 1.4。

在实验中，将直径为 170nm 的荧光珠作为样品，通过在耗散光的光路上（透镜 L6 与第一二向色镜 DM1 之间）设置一块电控挡板 E1，当电控挡板 E1 闭合时，挡住从第二透镜组射出的耗散光，只有激发光射入高数值孔径物镜 Obj，此时可视为共聚焦成像，得到如图 6（a）所示的无像差校正时的荧光珠图像。当电控挡板 E1 打开时，耗散光及皮秒激发都进入高数值孔径物镜 Obj，耗散光及皮秒激发在样品上重叠，形成如图 6（b）所示的受激发射损耗 STED 超分辨成像。对比图 6（a）与图 6（b），可以观察到耗散光作用后，激发光的有效点

扩展函数 (point spread function, PSF) 明显减小。

在本发明实施例中, 提供了一种超分辨成像系统, 包括飞秒激光器 Laser1、皮秒激光器 Laser2、第一数据采集卡 NI1、第二数据采集卡 NI2、空间光调制器 SLM 等, 飞秒激光器 Laser1 产生的耗散光与皮秒激光器 Laser2 产生的激发光射入样本后, 会产生荧光信号, 第二数据采集卡 NI2 将荧光信号转换为电压信息, 该电压信息作为遗传算法中的适应度值, 根据遗传算法对电压信息进行计算, 得到一个最大电压绝对值, 并将与最大电压绝对值对应的相位图作为相位补偿图, 通过将相位补偿图叠加到耗散光上, 对耗散光进行像差校正。与现有技术相比, 本发明实施例在 STED 超分辨成像系统中引入遗传算法的像差校正系统, 根据遗传算法得到相位补偿图, 通过将相位补偿图叠加到耗散光上, 对耗散光进行像差校正, 克服 STED 成像过程中引入的像差, 提高 STED 超分辨成像系统的成像深度和空间分辨率, 使得可以在物医学等方面得到广泛应用。

在上述实施例中, 对各个实施例的描述都各有侧重, 某个实施例中未详述的部分, 可以参见其它实施例的相关描述。

以上为对本发明所提供的一种超分辨成像系统的描述, 对于本领域的技术人员, 依据本发明实施例的思想, 在具体实施方式及应用范围上均会有改变之处, 综上, 本说明书内容不应理解为对本发明的限制。

权利要求书

[权利要求 1]

一种超分辨成像系统，其特征在于，所述系统包括：

飞秒激光器，用于产生耗散光，并入射至第一光调制装置；

所述第一光调制装置，设置在所述飞秒激光器的出射光路上，用于调制所述耗散光的偏振特性及强度；

玻璃棒，设置在所述第一光调制装置的出射光路上，用于对经过调制后的耗散光进行脉冲宽度展宽处理，使得所述耗散光的脉冲宽度为1皮秒；

第一透镜组，设置在所述玻璃棒的出射光路上，用于对脉冲宽度为1皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理；

第一透镜，设置在所述第一透镜组的出射光路上，用于将光斑直径扩大的耗散光聚焦耦合至100米单模保偏光纤；

所述100米单模保偏光纤，设置在所述第一透镜的出射光路上，用于将脉冲宽度为1皮秒的耗散光的脉冲宽度展宽至200皮秒；

第二透镜，设置在所述100米单模保偏光纤的出射光路上，用于对脉冲宽度为200皮秒的耗散光的光斑直径进行扩大处理，并入射至第二光调制装置；

所述第二光调制装置，设置在所述第二透镜的出射光路上，用于调制所述耗散光的偏振特性及强度；

所述空间光调制器，设置在所述第二光调制装置的出射光路上，将从所述第二光调制装置射出的耗散光反射至第二透镜组；

所述第二透镜组，用于对射入的耗散光的光斑直径进行缩小处理，并将光斑直径进行缩小处理的耗散光射入振镜扫描系统；

皮秒激光器，用于产生激发光，并入射至第一单模光纤；

所述第一单模光纤，设置在所述皮秒激光器的出射光路上，用于对射入的激发光进行模式调控；

第三透镜，设置在所述第一单模光纤的出射光路上，用于对进行模式调控后的激发光的光斑直径进行扩大处理，并入射至第三光

调制装置；

所述第三光调制装置，用于调制所述激发光的偏振特性及强度；
角反射器，设置在所述第三光调制装置的出射光路上，用于改变所述激发光所在的光路的光程，在时间上控制所述激发光及所述耗散光之间的脉冲间隔，并将所述激发光射入所述振镜扫描系统；

所述振镜扫描系统，用于对重叠的激发光及耗散光进行同步面阵扫描；

四分之一玻片，用于对经过所述振镜扫描系统扫描后的激发光及耗散光进行偏振处理，将所述激发光及所述耗散光由线偏振光调制成圆偏振光；

高数值孔径物镜，用于聚焦重叠的激发光及耗散光，将聚焦后的重叠的激发光及耗散光投射到样品上，同时收集所述样品反射回来的荧光信号；

滤镜，用于对所述荧光信号进行过滤，将预设波段的荧光信号射入第二单模光纤，并过滤掉所述预设波段以外的荧光信号；

第二单模光纤，用于将经过所述滤镜过滤后得到的荧光信号传输给光电倍增管；

所述光电倍增管，用于将经过所述滤镜过滤后得到的荧光信号进行放大；

第一数据采集卡，用于采集和分析所述光电倍增管收集到的荧光信号；

第二数据采集卡，用于将所述光电倍增管收集到的荧光信号转换为电压信息，所述电压信息作为遗传算法中的适应度值，根据遗传算法对所述电压信息进行计算，得到一个最大电压绝对值，并将与最大电压绝对值对应的相位图作为相位补偿图；

所述空间光调制器用于将所述相位补偿图叠加到所述耗散光上，对所述耗散光进行像差校正；还用于在所述空间光调制器的液晶

面上加载所述耗散光的螺旋相位信息，将所述耗散光由高斯型光转化成环形光。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述皮秒激光器通过外接线与所述飞秒激光器相连接，所述皮秒激光器由所述飞秒激光器触发输出所述激发光。

[权利要求 3] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述第一光调制装置包括第一半波片及第一格兰激光棱镜，所述第二光调制装置包括第二半波片及第二格兰激光棱镜，所述第三光调制装置包括第三半波片及第三格兰激光棱镜；

所述第一半波片，设置在所述飞秒激光器的出射光路上，用于调制从所述飞秒激光器射出的耗散光的偏振特性；

所述第一格兰激光棱镜，设置在所述第一半波片的出射光路上，用于对调制后的耗散光的强度进行调整；

所述第二半波片，用于调制从所述第二透镜射出的耗散光的偏振特性；

所述第二格兰激光棱镜，设置在所述第二半波片的出射光路上，用于对射入的调制后的耗散光的强度进行调整；

所述第三半波片，用于调制从所述第一单模光纤射出的激发光的偏振特性；

所述第三格兰激光棱镜，设置在所述第三波片的出射光路上，用于对射入的调制后的激发光的强度进行调整。

[权利要求 4] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述高数值孔径物镜的放大倍率为100倍，数值孔径为1.4。

[权利要求 5] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述系统还包括：分束器及电荷耦合元件；

所述分束器，用于将所述高数值孔径物镜收集并射出的荧光信号分成两部分，一部分反射后进入所述电荷耦合元件，另一部分透射进入所述滤镜；

所述电荷耦合元件，用于实时监测射入的荧光信号中的耗散光的光斑和激发光的光斑的重叠情况。

- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述系统还包括：第一二向色镜及第二二向色镜；
所述第一二向色镜，用于透射从所述第二透镜组射出的耗散光，并反射所述荧光信号；
所述第二二向色镜，用于反射从所述角反射器射出的激发光，并透射所述荧光信号。
- [权利要求 7] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述第二二向色镜，还用于调整所述荧光信号中的耗散光的传输方向及激发光的传输方向，使所述荧光信号中的所述耗散光及所述激发光重叠。
- [权利要求 8] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述分束器将所述荧光信号按照 9:1 分成两部分。
- [权利要求 9] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述耗散光和所述激发光的脉冲峰值之间的间隔为160~200ps。
- [权利要求 10] 根据权利要求1所述的系统，其特征在于，所述系统还包括电控挡板，当所述电控挡板闭合时，挡住从所述第二透镜组射出的耗散光。

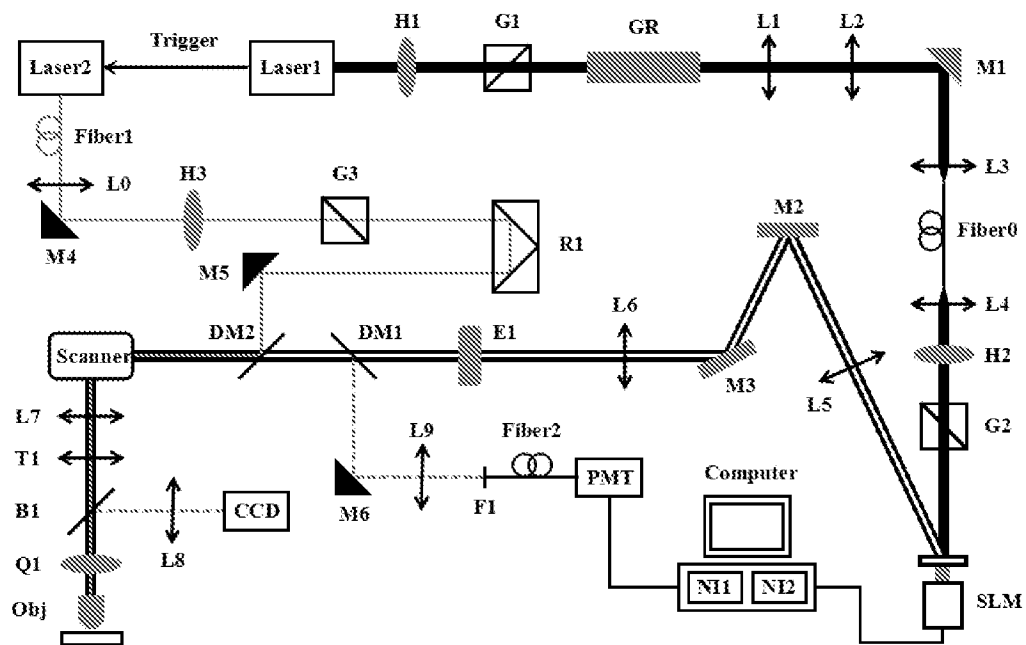


图 1

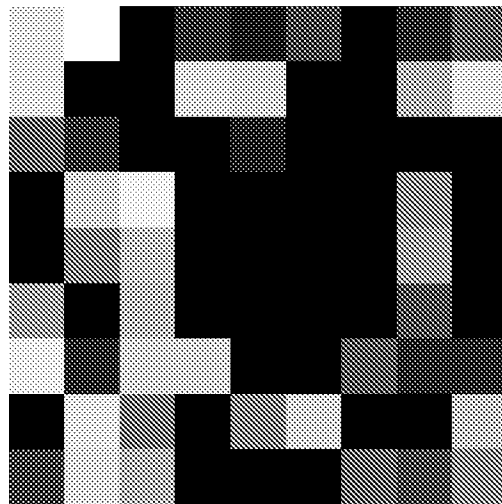


图 2

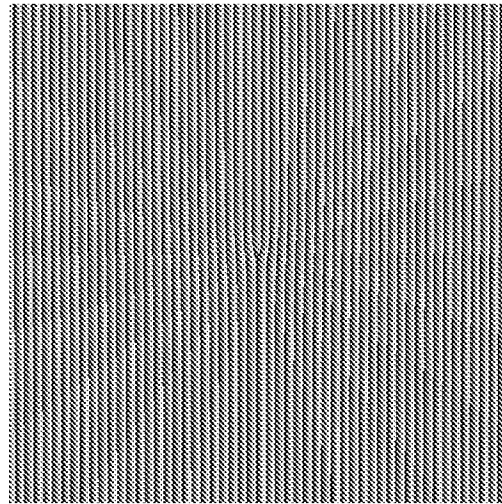


图 3

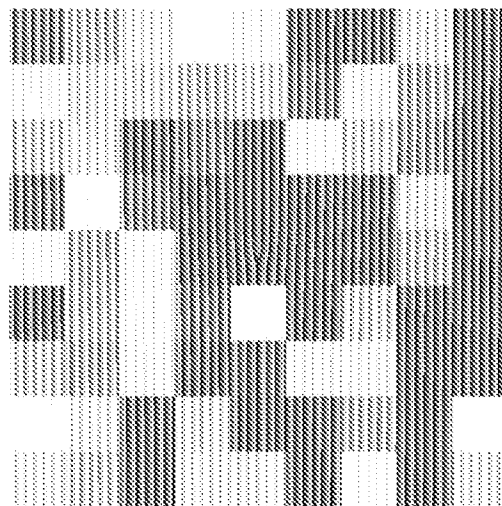


图 4

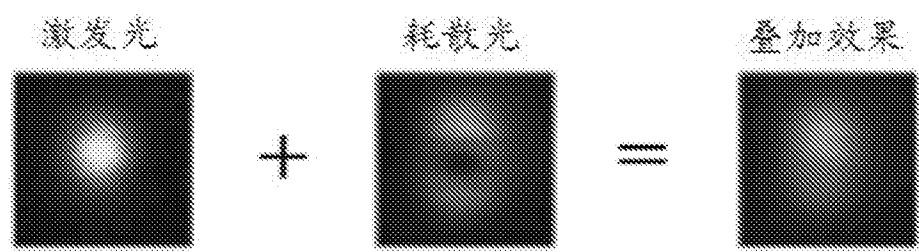


图 5

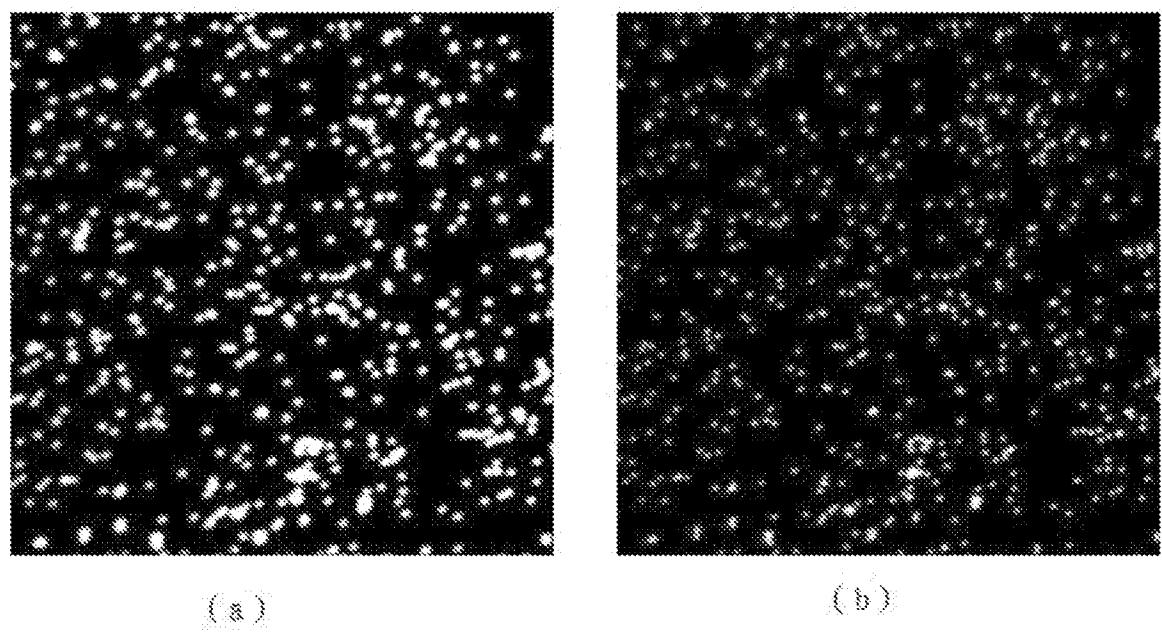


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/118137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B 27/58(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; G02B 26/06(2006.01)i; G02B 21/00(2006.01)i; G06N 3/12(2006.01)i

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)

G02B;G01N21/-;G06N3/-

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)

CNPAT, CNKI, EPODOC, WPI: 深圳大学, 严伟, 屈军乐, 王璐玮, 叶彤, 超分辨, 成像, 显微镜, 激光, 耗散, 损耗, 激发, 荧光, 光电倍增管, 遗传算法, 相位, 补偿, 校正, 飞秒, 皮秒, 展宽, 光斑, 扩大, 偏振, 调制, 缩小, 扫描, super, stimulate, emission, depletion, microscopy, STED, laser, excitation, fluorescence, genetic, algorithm, phase, compensation, correct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	CN 108132543 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 08 June 2018 (2018-06-08) claims 1-10	1-10
Y	CN 105241857 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 13 January 2016 (2016-01-13) description, paragraphs [0022]-[0047], and figure 1	1-10
Y	CN 101078808 A (THE INSTITUTE OF OPTICS AND ELECTRONICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 28 November 2007 (2007-11-28) description, page 3, paragraphs 2-5 and page 5, paragraph 4	1-10
A	CN 103616330 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 05 March 2014 (2014-03-05) entire document	1-10
A	CN 105182523 A (PEKING UNIVERSITY) 23 December 2015 (2015-12-23) entire document	1-10
A	CN 103389573 A (BEIJING INFORMATION SCIENCE & TECHNOLOGY UNIVERSITY) 13 November 2013 (2013-11-13) entire 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

28 August 2018

Date of mailing of the international search report

21 September 2018

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

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/118137

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014347723 A1 (THE UNIVERSITY OF DUNDEE) 27 November 2014 (2014-11-27) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/118137

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108132543	A	08 June 2018	None			
CN	105241857	A	13 January 2016	CN	105241857	B	29 December 2017
CN	101078808	A	28 November 2007	CN	100580501	C	13 January 2010
CN	103616330	A	05 March 2014	None			
CN	105182523	A	23 December 2015	CN	105182523	B	07 November 2017
				WO	2017049752	A1	30 March 2017
CN	103389573	A	13 November 2013	CN	103389573	B	08 April 2015
US	2014347723	A1	27 November 2014	US	9304310	B2	05 April 2016
				WO	2013088106	A1	20 June 2013
				EP	2791728	A1	22 October 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/118137

A. 主题的分类 G02B 27/58(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; G02B 26/06(2006.01)i; G02B 21/00(2006.01)i; G06N 3/12(2006.01)i 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) G02B;G01N21/-;G06N3/- 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)) CNPAT, CNKI, EPODOC, WPI: 深圳大学, 严伟, 屈军乐, 王璐玮, 叶彤, 超分辨, 成像, 显微镜, 激光, 耗散, 损耗, 激发, 荧光, 光电倍增管, 遗传算法, 相位, 补偿, 校正, 飞秒, 皮秒, 展宽, 光斑, 扩大, 偏振, 调制, 缩小, 扫描, super, stimulate, emission, depletion, microscopy, STED, laser, excitation, fluorescence, genetic, algorithm, phase, compensation, correct		
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
E	CN 108132543 A (深圳大学) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 权利要求1-10	1-10
Y	CN 105241857 A (深圳大学) 2016年 1月 13日 (2016 - 01 - 13) 说明书第[0022]-[0047]段, 图1	1-10
Y	CN 101078808 A (中国科学院光电技术研究所) 2007年 11月 28日 (2007 - 11 - 28) 说明书第3页第2-5段、第5页第4段	1-10
A	CN 103616330 A (中国科学院化学研究所) 2014年 3月 5日 (2014 - 03 - 05) 全文	1-10
A	CN 105182523 A (北京大学) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 全文	1-10
A	CN 103389573 A (北京信息科技大学) 2013年 11月 13日 (2013 - 11 - 13) 全文	1-10
A	US 2014347723 A1 (THE UNIVERSITY OF DUNDEE) 2014年 11月 27日 (2014 - 11 - 27) 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 2018年 8月 28日		国际检索报告邮寄日期 2018年 9月 21日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 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 朱磊 电话号码 86-(10)-53962379

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/118137

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	108132543	A	2018年 6月 8日	无	
CN	105241857	A	2016年 1月 13日	CN	105241857 B 2017年 12月 29日
CN	101078808	A	2007年 11月 28日	CN	100580501 C 2010年 1月 13日
CN	103616330	A	2014年 3月 5日	无	
CN	105182523	A	2015年 12月 23日	CN	105182523 B 2017年 11月 7日
				WO	2017049752 A1 2017年 3月 30日
CN	103389573	A	2013年 11月 13日	CN	103389573 B 2015年 4月 8日
US	2014347723	A1	2014年 11月 27日	US	9304310 B2 2016年 4月 5日
				WO	2013088106 A1 2013年 6月 20日
				EP	2791728 A1 2014年 10月 22日