

(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
2020 年 4 月 2 日 (02.04.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/062609 A1

- (51) 国际专利分类号:
G02B 21/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/121206
- (22) 国际申请日: 2018 年 12 月 14 日 (14.12.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201811125387.8 2018 年 9 月 26 日 (26.09.2018) CN
- (71) 申请人: 中国科学院化学研究所 (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号袁景和, Beijing 100190 (CN)。
- (72) 发明人: 袁景和 (YUAN, Jinghe); 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号, Beijing 100190 (CN)。 于

建强 (YU, Jianqiang); 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号袁景和, Beijing 100190 (CN)。 方晓红 (FANG, Xiaohong); 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号袁景和, Beijing 100190 (CN)。

(74) 代理人: 北京辰权知识产权代理有限公司 (BEIJING CHEN QUAN INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 中国北京市海淀区中关村东路 66 号世纪科贸大厦 B 座 1501 室冯楠, Beijing 100190 (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,

(54) **Title:** ILLUMINATION SYSTEM FOR STED OPTICAL MICROSCOPE AND STED OPTICAL MICROSCOPE

(54) 发明名称: 用于 STED 光学显微镜的照明系统及 STED 光学显微镜

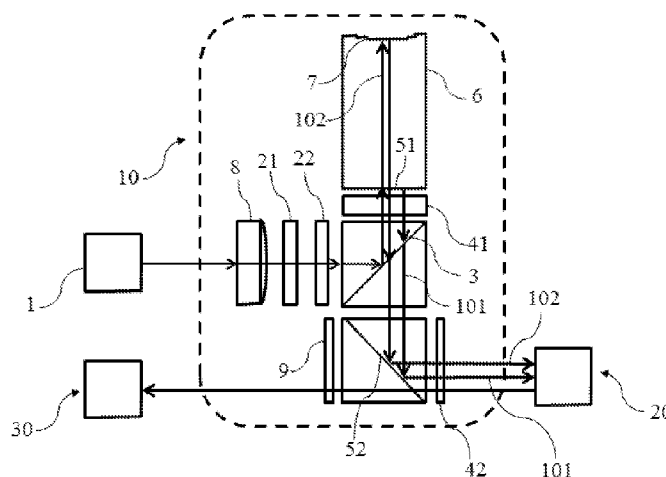


图 1

(57) **Abstract:** An illumination system (10) for an STED optical microscope and an STED optical microscope. The illumination system (10) comprises an illumination light path consisting of an illumination light source and an optical element. The illumination light path comprises a first light filter (21), a second light filter (22), a polarizing light splitter (3), a first quarter wave plate (41), a first dichroic element (51), a light path delay unit (6), a phase plate (7), a second dichroic element (52), and a second quarter wave plate (42) arranged in sequence along the transmission direction of the light path. The light beam emitted from the illumination light source (1) is divided into two coaxial light beams after transmitted by the illumination light path. A first light beam (101) is incident to a microscope objective to form a first light spot, a second light beam (102) is incident to the microscope objective to form a second light spot, and the center of the first light spot coincides with that of the second light spot. Use of an integrated optical module design implements coaxial input and output of exciting light, depleted light, and confocal detection light path, and voids unstable temperature and vibration inherent in

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, 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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

physical adjustment and mechanical adjustment mechanisms for geometrical relationships between the elements, thereby improving the reliability of an STED apparatus.

(57) 摘要: 一种用于STED光学显微镜的照明系统(10)及STED光学显微镜, 照明系统(10)包括照明光源和由光学元件组成的照明光路, 照明光路包括沿光路传输方向依次设置的第一滤光片(21)、第二滤光片(22)、偏振分光器(3)、第一1/4波片(41)、第一二向色性元件(51)、光程延迟单元(6)、位相板(7)、第二二向色性元件(52)及第二1/4波片(42), 照明光源(1)发出的光束经照明光路的传输后分成两束同轴的光束, 第一光束(101)入射至显微物镜形成第一光斑, 第二光束(102)入射至显微物镜形成第二光斑, 且第一光斑和第二光斑的中心重合。采用一体化的集成光学模块设计, 实现激发光、损耗光及共聚焦探测光路的共轴输入与输出, 同时避免了各元件相互几何关系的物理调节及机械调节机构所固有的温度和振动不稳定性, 提高STED仪器的可靠性。

用于 STED 光学显微镜的照明系统及 STED 光学显微镜

技术领域

本发明涉及显微成像技术领域，特别是涉及一种用于 STED 光学显微镜的照明系统及 STED 光学显微镜。

背景技术

当今生命科学中的显微成像研究大约 80% 仍然使用光学显微镜，可以说生命科学的进步伴随着光学显微镜的发展。然而由于光学衍射极限的存在，使得光学显微镜的空间分辨率被限制在半个波长左右，这样的分辨率严重阻碍了生物学家们对亚细胞结构的精细研究。STED (受激辐射损耗显微镜, Stimulated Emission Depletion-STED) 通过使用一束 STED 光形成空壳形状光斑，将激发光衍射光斑周围的荧光分子通过受激辐射耗尽转换为非辐射态，实现了好于 50nm 的空间分辨率。由于使用全光设置，图像采集时间与传统共聚焦显微镜相同，对样品准备没有特殊要求，因此可以实现活细胞内亚细胞结构的实时成像和动态跟踪。

超分辨 STED 荧光显微镜发明以来，已经被广泛应用于生物学和生命医学科学研究中。但在实际应用中 STED 显微镜结构复杂，难以实现激发光斑与 STED 空壳形光斑的高精度长时间稳定对准（纳米级）。

发明内容

本发明的目的是至少解决上述缺陷与不足之一，该目的是通过以下技术方案实现的。

本发明提供了一种用于 STED 光学显微镜的照明系统，包括照明光源和由光学元件组成的照明光路，所述照明光源发出的光束经过所述照明光路后聚焦照射到样品表面激发样品中的荧光物质发射荧光，所述照明光路包括沿光路传输方向依次设置的第一滤光片、第二滤光片、偏振分光器、第一 1/4 波片、第一二向色性元件、光程延迟单元、位相板、第二二向色性元件以及第二 1/4 波片，

所述照明光源发出的光束经过所述第一滤光片、第二滤光片滤光后获得一定波长的第一光束和第二光束，所述第一光束和所述第二光束分别经所述偏振分光器分光后形成线偏振光，并经反射后依次入射至所述第一 $1/4$ 波片和所述第一二向色性元件，所述第一光束经所述第一 $1/4$ 波片后形成圆偏振光，经所述第一二向色性元件反射后，再次经所述第一 $1/4$ 波片后形成线偏振光，然后依次经所述偏振分光器透射、所述第二二向色性元件反射以及所述第二 $1/4$ 波片转换为圆偏振光后入射至显微成像系统的显微物镜汇聚，在所述显微物镜的焦面处形成第一光斑；所述第二光束经所述第一 $1/4$ 波片后形成圆偏振光，经所述第一二向色性元件透射后入射至所述光程延迟单元和所述位相板，所述第二光束经所述位相板反射后，依次经所述光程延迟单元出射、所述第一二向色性元件透射、所述第一 $1/4$ 波片转换为线偏振光、所述偏振分光器透射、所述第二二向色性元件反射以及所述第二 $1/4$ 波片转换为圆偏振光后入射至显微成像系统的显微物镜汇聚，在所述显微物镜的焦面处形成第二光斑，所述第一光斑的中心和所述第二光斑的中心重合。

进一步地，所述第一光束为激发光，所述第一光斑为实心光斑；所述第二光束为相对于所述第一光束的损耗光，所述第二光斑为空心光斑。

进一步地，所述第一滤光片为中性滤光片，用于对所述照明光源发射的总激光的强度进行调节；所述第二滤光片为双带通滤光片，用于滤出一定波长的所述第一光束和所述第二光束，并对所述第一光束的强度和所述第二光束的强度进行调节，所述第一滤光片和所述第二滤光片沿光路同轴布置。

进一步地，所述第一 $1/4$ 波片能够将入射的所述第一光束和第二光束由线偏振光转换为圆偏振光，也能够将入射的所述第一光束和第二光束由圆偏振光转换为线偏振光；所述第二 $1/4$ 波片能够将线偏振光转换为圆偏振光。

进一步地，所述第一二向色性元件为选择性透射介质膜，所述介质膜镀在所述光程延迟单元的入射端，所述介质膜能够使入射的所述第一光束发生反射并且能够使入射的所述第二光束发生透射；所述第二二向色性元件为二向色性片，所述二向色性片能够使入射的所述第一光束和第二光束均发生反射并且能够使所述样品发射的荧光发生透射。

进一步地，所述光程延迟单元能够使所述第二光束产生光学延迟。

进一步地,所述位相板为反射式位相板,设置在所述光程延迟单元的远端,所述第二光束进入所述光程延迟单元后入射至所述位相板上,经反射后能够沿原光路返回至所述光程延迟单元的入射端,并且,所述位相板能够对入射的所述第二光束的波前进行调制。

进一步地,所述照明光源与所述第一滤光片之间还设有用于对所述照明光源发出的光束进行扩束和整形的扩束镜。

本发明还提供了一种包括上述的用于 STED 光学显微镜的照明系统,该 STED 光学显微镜还包括显微成像系统和荧光探测系统,所述显微成像系统包括显微物镜,所述照明光源发出的光束经过所述照明系统的照明光路后分成两束同轴的第一光束和第二光束,所述第一光束和所述第二光束分别经所述显微物镜汇聚后照射至样品上激发所述样品中的荧光物质发射荧光,所述荧光经所述显微物镜汇聚后进入所述荧光探测系统进行检测,所述第一光束的光轴和所述第二光束的光轴均与所述荧光探测系统的探测光路的光轴同轴。

进一步地,所述显微成像系统的出射端与所述荧光探测系统之间设有用于对所述荧光进行滤波的第三滤光片。

本发明的优点如下:

(1)本发明提供的用于 STED 光学显微镜的照明系统通过一体化集成设计,避免了各单元器件相互几何关系的物理调节以及机械调节机构所固有的温度和振动不稳定性,使 STED 仪器设备能够在各种环境下长期可靠工作。

(2)本发明通过光学冷加工和光学镀膜,能够从激光光源中滤出合适波长的激发光和损耗光,光学镀膜还实现了两者相对强度的调控,中性滤光片实现总光强的调控。

(3)本发明通过组合使用偏振分光器和波片,使得光路紧凑,有利于用更少的光学元件实现光束的转向和光束的偏振态控制,并且使各个主要光学元件可以通过端面粘合的方式组合成一体化集成模块,在缩小器件体积的同时,使器件对温度和环境振动不敏感,提高可靠性。

(4)本发明通过二元光学加工工艺,在光程延迟单元上加工有位相板,对损耗光进行反射式位相调控,能够产生 STED 技术中关键的、具有一定时延的与激发光严格同心的位相调制光束(损耗光经物镜汇聚后形成空壳形光斑)。

附图说明

通过阅读下文优选实施方式的详细描述，各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的，而并不认为是对本发明的限制。而且在整个附图中，用相同的参考符号表示相同的部件。

图1为本发明实施例提供的用于STED光学显微镜的照明系统的结构示意图；

图2为根据现有的共聚焦显微镜照射40nm荧光微球样品获得的共聚焦成像图；

图3为本发明实施例提供的用于STED光学显微镜的照明系统照射40nm荧光微球样品在图2的同一区域获得的STED成像图；

图中附图标记如下：

10-照明系统 20-显微成像系统

30-荧光探测系统 1-激光器

21-第一滤光片 22-第二滤光片

3-偏振分光器 41-第一1/4波片

42-第二1/4波片 51-第一二向色性元件

52-第二二向色性元件 6-光程延迟单元

7-位相板 8-扩束镜

9-第三滤光片 101-第一光束

102-第二光束

具体实施方式

下面将参照附图更详细地描述本公开的示例性实施方式。虽然附图中显示了本公开的示例性实施方式，然而应当理解，可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施方式所限制。相反，提供这些实施方式是为了能够更透彻地理解本公开，并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

图1示出了根据本发明的实施方式提供的用于STED光学显微镜的照明系统的结构示意图。该照明系统适用于STED光学显微镜，STED光学显微镜包括照明系统10、显微成像系统20和荧光探测系统30。照明系统10发出的光束经显

微成像系统 20 的显微物镜聚焦后照射到样品表面能够激发样品中的荧光物质发射荧光,样品的荧光又经所述显微物镜汇聚后入射至荧光探测系统 30 进行检测。

如图 1 所示,本发明提供的用于 STED 光学显微镜的照明系统包括照明光源和由光学元件组成的照明光路,本实施例中,照明光源为激光器 1,能够发射多波长的激光或者多激光组合。激光器 1 发出的激光光束经过照明光路后聚焦照射到样品表面,照明光路包括沿光路传输方向依次设置的第一滤光片 21、第二滤光片 22、偏振分光器 3、第一 $1/4$ 波片 41、第一二向色性元件 51、光程延迟单元 6、位相板 7、第二二向色性元件 52 以及第二 $1/4$ 波片 42,照明光源 1 发出的光束经过第一滤光片 21 及第二滤光片 22 滤光后获得第一光束 101 和第二光束 102 两束光,第一光束 101 和第二光束 102 分别经偏振分光器 3 分光后入射到第一 $1/4$ 波片 41 产生圆偏振光后入射至第一二向色性元件 51。入射至第一二向色性元件 51 的第一光束 101 经反射后依次经第一 $1/4$ 波片 41 产生线偏振光、偏振分光器 3 透射、第二二向色性元件 52 反射以及第二 $1/4$ 波片 42 转换为圆偏振光后入射至显微物镜汇聚,在物镜的焦面处形成第一光斑;入射至第一二向色性元件 51 的第二光束 102 经透射后入射至光程延迟单元 6 产生光学延迟,第二光束 102 经设置在光程延迟单元 6 的远端的位相板 7 反射后依次经光程延迟单元 6 出射、第一二向色性元件 51 透射、第一 $1/4$ 波片 41 产生线偏振光、偏振分光器 3 透射、第二二向色性元件 52 反射以及第二 $1/4$ 波片 42 转换为圆偏振光后也入射至显微物镜汇聚,在物镜的焦面处形成第二光斑,第一光斑的中心和第二光斑的中心重合。在图 1 中,出于使图清晰的原因,对第一光束 101 和第二光束 102 进行垂直偏移,通常在实际中尽可能地使各光束严格同轴。

第一光束 101 为激发光,用于激发荧光,对样品进行荧光成像;第二光束 102 是相对于第一光束 101 的损耗光,用于抑制荧光,退激发第一光斑的外围区域上处于荧光发射态的荧光物质,使该外围区域不再产生荧光。

第一滤光片 21 为中性滤光片,第一滤光片 21 能够过滤光束,对照明光源 1 发出的总激光的强度进行调节;第二滤光片 22 为双带通滤光片,用于滤出适合波长的第一光束 101 和第二光束 102,并对两束光的强度进行调节。优选实

施中，第二滤光片 22 采用光学镀膜，对激发光和损耗光两者的相对强度进行调控。

激光器 1 与第一滤光片 21 之间设有扩束镜 8，扩束镜 8 能够对激光光束进行扩束和整形。第一滤光片 21 与第二滤光片 22 沿光路同轴布置，并且与激光器 1 的光轴重合；扩束镜 8 的轴心线也与激光器 1 的光轴重合。

偏振分光器 3 能够将入射光分离为偏振方向相互垂直的两束线偏振光，并分别反射和透射。第一光束 101 和第二光束 102 两光束分别经过偏振分光器 3 后形成线偏振光，P 偏振光束透射后被丢弃，S 偏振光束反射后依次入射到第一 1/4 波片 41 和第一二向色性元件 51 上。

第一 1/4 波片 41 和第二 1/4 波片 42 用于调节光束的偏振态，第一 1/4 波片 41 能够使入射的第一光束 101 和第二光束 102 由线偏振光转换为圆偏振光，也能够使入射的第一光束 101 和第二光束 102 由圆偏振光转换为线偏振光；第二 1/4 波片能够使第一光束 101 和第二光束 102 由线偏振光转换为圆偏振光。

第一二向色性元件 51 为选择性透射介质膜，该介质膜能够使入射的第一光束 101 发生反射并且能够使第二光束 102 发生透射。第二二向色性元件 52 为选择性透射二向色性片，该二向色性片能够使入射的第一光束 101 和第二光束 102 均发生反射、使样品发射的荧光发生透射。优选实施中，将第一二向色性元件 51 的介质膜镀在光程延迟单元 6 入射端的表面，不仅能够缩小整个光路系统的体积，使光学元件的布置更合理紧凑，还能够降低对温度、振动等环境因素对显微镜的影响。

光程延迟单元 6 为两端严格平行的光学玻璃，并且其长度可根据实际需要设计，从而能够产生合适延迟的第一光束 101 与第二光束 102。位相板 7 为反射式位相板，设置在光程延迟单元 6 的远端，并且垂直于光程延迟单元 6 的光轴（位相板 7 的中心线与光程延迟单元 6 的光轴重合），用于调制损耗光波前和光程，在显微物镜的焦面上产生空壳形焦斑。通过二元光学加工工艺，在位相板 7 上对损耗光进行反射式位相调控，能够产生 STED 技术中关键的、具有一定时延的与激发光严格同心的位相调制光束（损耗光经物镜汇聚后形成空壳形光斑）。

具体实施中，光程延迟单元 6 和位相板 7 可以为一体式结构，也可以为分

体式结构。优选实施中，将光程延迟单元 6 和位相板 7 设置为一体式结构，在光程延迟单元 6 的出射端的表面加工位相板 7，通过集成化设计，使光学元件的布置更紧凑，同时还能够减少温度、振动等外界环境对光路的影响，提高光学系统的可靠性。

第一光束 101 经第一 $1/4$ 波片 41 后转换为圆偏振光，经第一二向色性元件 51 反射后，再次经第一 $1/4$ 波片 41 后形成线偏振光，入射至偏振分光器 3 发生透射。第二光束 102 经第一 $1/4$ 波片 41 后转换为圆偏振光，再经第一二向色性元件 51 透射后进入光程延迟单元 6 产生光学延迟，并入射至设置在光程延迟单元 6 的远端的位相板 7 上，第二光束 102 经位相板 7 进行波前调制反射后沿原光路返回至光程延迟单元 6 的入射端，经第一二向色性元件 51 透射至第一 $1/4$ 波片 41 转换为线偏振光，再经偏振分光器 3 透射后，在偏振分光器 3 处与第一光束 101 重新汇合。由于第一光束 101 不经过光程延迟单元 6，第二光束 102 经过光程延迟单元 6，二者之间会产生固定的脉冲时间延迟，并且重新汇合后的第一光束 101 和第二光束 102 同轴。

重新汇合后的第一光束 101 和第二光束 102 分别经过第二二向色性元件 52 反射后再经过第二 $1/4$ 波片 42 将线偏振光转换为圆偏振光，然后进入显微成像系统，由聚焦物镜汇聚照射在样品上，形成同心的光斑。第一光束 101 汇聚照射在样品上，形成实心光斑；第二光束 102 汇聚照射在样品上，形成空心光斑。第一光束 101 与第二光束 102 波长不同，在经过照明光路的同轴传递后将样品表面激发出荧光，上述实心光斑与上述空心光斑重叠，实心光斑激发样品上的荧光物质发出荧光，而空心光斑抑制了该荧光物质外围所发出的荧光，这样就只有中间一个小于衍射极限的点发射荧光并被观测到。激发的荧光经过第三滤光片 9 滤波后被荧光检测系统 30 接收进行检测。

第一 $1/4$ 波片 41 使经偏振分光器 3 反射后的光束由线偏振光转换为圆偏振光，使第二次入射的圆偏振光转化为线偏振光后入射至偏振分光器 3 发生透射，实现光路的顺利传输。利用第二 $1/4$ 波片 42 将进入显微成像系统的激发光设置为圆偏振光，能够获得较高的荧光激发效率，获得较好的空壳性焦斑。

本实施例中，偏振分光器 3 与第一 $1/4$ 波片 41 相连，并将第一二向色性元件 51 镀在光程延迟单元 6 的表面，以调控激发光、损耗光的偏振属性和光路传

输路径；第二二向色性元件 52 与第二 $1/4$ 波片 42 相连，以调节重新汇合后的激发光和损耗光的偏振态、改变光线传播方向。通过组合使用偏振分光器 3 和波片，使得光路紧凑，有利于用更少的光学元件实现光束的转向和光束的偏振态控制，并且使各个主要光学元件可以通过端面粘合的方式组合成一体化集成模块，在缩小器件体积的同时，使器件对温度和环境振动不敏感，提高可靠性。

第三滤光片 9 为荧光带通滤光片，设置在显微成像系统 20 与荧光检测系统 30 之间，样品发射的荧光经过第三滤光片 9 滤除荧光以外的其它光（包括散射的第一光束 101 和第二光束 102）后，进入荧光探测系统 30 进行数据采集。本实施方式中，将第三滤光片 9 设置在第二二向色性元件 52 的一侧，并且将第二二向色性元件 52 设置为能够透射荧光的镜片，能够保证样品发射的荧光直射进入荧光检测系统 30 进行检测。

图 2 示出了采用传统的共聚焦显微镜对直径为 40nm 的荧光微球样品进行共聚焦成像试验获得的成像图，图 3 示出了采用上述的 STED 光学显微镜对直径为 40nm 的荧光微球样品在图 2 的同一区域进行受激辐射耗尽（STED）显微成像试验获得的成像图。从图中可以看出传统的共聚焦成像（图 2 中的虚线框内）不能分辨的纳米微球，而本发明的 STED 超分辨成像（图 3 中虚线框内）可清晰地辨认出 3 个荧光微球，经测量荧光微球显微成像的半高全宽小于 50nm。由上述对比可知，采用本发明提供的用于 STED 光学显微镜的照明系统能够大大提高成像的分辨率，获得超分辨成像的效果。

本发明还提供了一种包括上述照明系统的 STED 光学显微镜。该 STED 光学显微镜还包括显微成像系统 20 和荧光探测系统 30，显微成像系统 20 包括所述显微物镜，照明光源发出的光束经过上述照明系统的照明光路分成两束同轴的第一光束 101 和第二光束 102，第一光束 101 和第二光束 102 分别经显微物镜汇聚后照射至样品上激发样品中的荧光物质发射荧光，荧光经显微物镜汇聚后进入荧光探测系统 30 进行检测。第一光束 101、第二光束 102 以及荧光探测系统 30 的探测光路的光轴同轴，并且上述显微物镜的焦平面与第一光束 101、第二光束 102 以及荧光探测系统的探测光路的光轴均垂直。

本发明提供的用于 STED 光学显微镜的照明系统，采用一体化的集成光学模块设计，能够实现激发光、损耗光以及共聚焦探测光路的共轴输入与输出，实

现激发光斑与 STED 空壳形光斑的高精度长时间稳定对准；同时能够避免各单元器件相互几何关系的物理调节、以及机械调节机构所固有的温度和振动不稳定性，使得 STED 仪器设备能够在各种环境下长期可靠、稳定地工作。

需要指出的是，在本发明的描述中，术语“第一”、“第二”仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来，而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。

以上所述，仅为本发明较佳的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到的变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此，本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

权利要求书

1. 一种用于 STED 光学显微镜的照明系统，包括照明光源和由光学元件组成的照明光路，所述照明光源发出的光束经过所述照明光路后聚焦照射到样品表面激发样品中的荧光物质发射荧光，其特征在于，所述照明光路包括沿光路传输方向依次设置的第一滤光片、第二滤光片、偏振分光器、第一 $1/4$ 波片、第一二向色性元件、光程延迟单元、位相板、第二二向色性元件以及第二 $1/4$ 波片，所述照明光源发出的光束经过所述第一滤光片、第二滤光片滤光后获得一定波长的第一光束和第二光束，所述第一光束和所述第二光束分别经所述偏振分光器分光后形成线偏振光，并经反射后依次入射至所述第一 $1/4$ 波片和所述第一二向色性元件，所述第一光束经所述第一 $1/4$ 波片后形成圆偏振光，经所述第一二向色性元件反射后，再次经所述第一 $1/4$ 波片后形成线偏振光，然后依次经所述偏振分光器透射、所述第二二向色性元件反射以及所述第二 $1/4$ 波片转换为圆偏振光后入射至显微成像系统的显微物镜汇聚，在所述显微物镜的焦面处形成第一光斑；所述第二光束经所述第一 $1/4$ 波片后形成圆偏振光，经所述第一二向色性元件透射后入射至所述光程延迟单元和所述位相板，所述第二光束经所述位相板反射后，依次经所述光程延迟单元出射、所述第一二向色性元件透射、所述第一 $1/4$ 波片转换为线偏振光、所述偏振分光器透射、所述第二二向色性元件反射以及所述第二 $1/4$ 波片转换为圆偏振光后入射至显微成像系统的显微物镜汇聚，在所述显微物镜的焦面处形成第二光斑，所述第一光斑的中心和所述第二光斑的中心重合。

2. 根据权利要求 1 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述第一光束为激发光，所述第一光斑为实心光斑；所述第二光束为相对于所述第一光束的损耗光，所述第二光斑为空心光斑。

3. 根据权利要求 2 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述第一滤光片为中性滤光片，用于对所述照明光源发射的总激光的强度进行调节；所述第二滤光片为双带通滤光片，用于滤出一定波长的所述第一光束和所述第二光束，并对所述第一光束的强度和所述第二光束的强度进行调节，所述第一滤光片和所述第二滤光片沿光路同轴布置。

4. 根据权利要求 2 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述偏振分光器能够将入射的光束分离为偏振方向相互垂直的两束线偏振光，

分别反射和透射。

5. 根据权利要求 2 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述第一 $1/4$ 波片能够将入射的所述第一光束和第二光束由线偏振光转换为圆偏振光，也能够将入射的所述第一光束和第二光束由圆偏振光转换为线偏振光；所述第二 $1/4$ 波片能够将线偏振光转换为圆偏振光。

6. 根据权利要求 2 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述第一二向色性元件为选择性透射介质膜，所述介质膜镀在所述光程延迟单元的入射端，所述介质膜能够使入射的所述第一光束发生反射并且能够使入射的所述第二光束发生透射；所述第二二向色性元件为二向色性片，所述二向色性片能够使入射的所述第一光束和第二光束均发生反射并且能够使所述样品发射的荧光发生透射。

7. 根据权利要求 2 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述光程延迟单元能够使所述第二光束产生光学延迟。

8. 根据权利要求 7 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述位相板为反射式位相板，设置在所述光程延迟单元的远端，所述第二光束进入所述光程延迟单元后入射至所述位相板上，经反射后能够沿原光路返回至所述光程延迟单元的入射端，并且，所述位相板能够对入射的所述第二光束的波前进行调制。

9. 根据权利要求 1 所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，其特征在于，所述照明光源与所述第一滤光片之间还设有用于对所述照明光源发出的光束进行扩束和整形的扩束镜。

10. 一种 STED 光学显微镜，其特征在于，包括根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的用于 STED 光学显微镜的照明系统，所述 STED 光学显微镜还包括显微成像系统和荧光探测系统，所述显微成像系统包括显微物镜，所述照明光源发出的光束经过所述照明系统的照明光路后分成两束同轴的第一光束和第二光束，所述第一光束和所述第二光束分别经所述显微物镜汇聚后照射至样品上激发所述样品中的荧光物质发射荧光，所述荧光经所述显微物镜汇聚后进入所述荧光探测系统进行检测，所述第一光束的光轴和所述第二光束的光轴均与所述荧光探测系统的探测光路的光轴同轴。

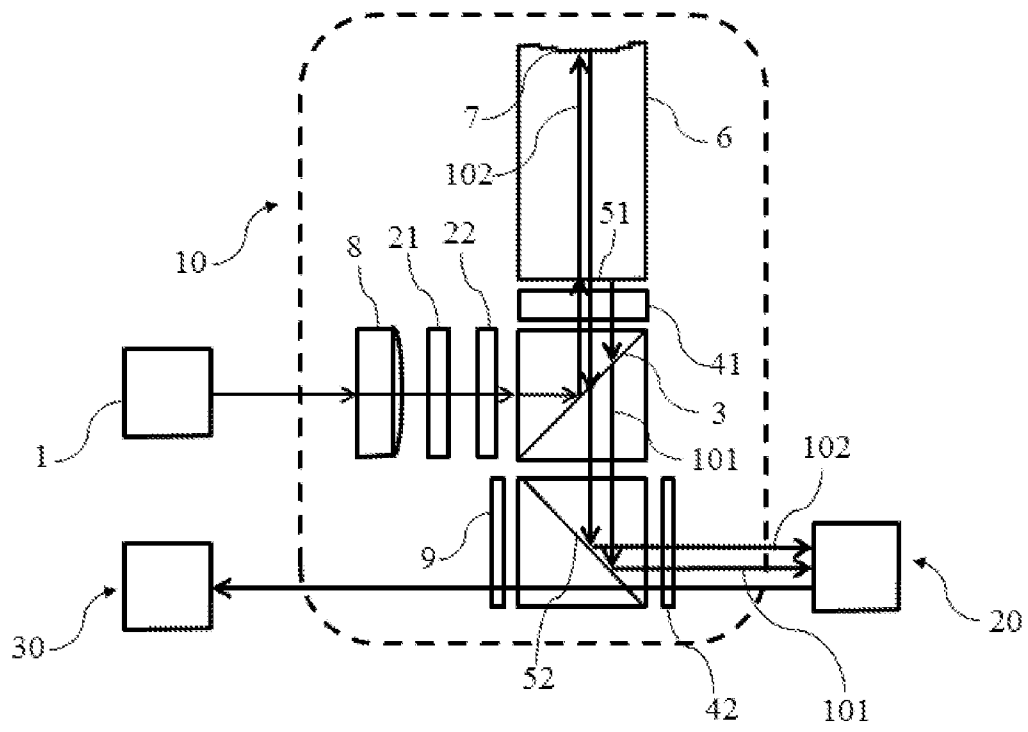


图 1

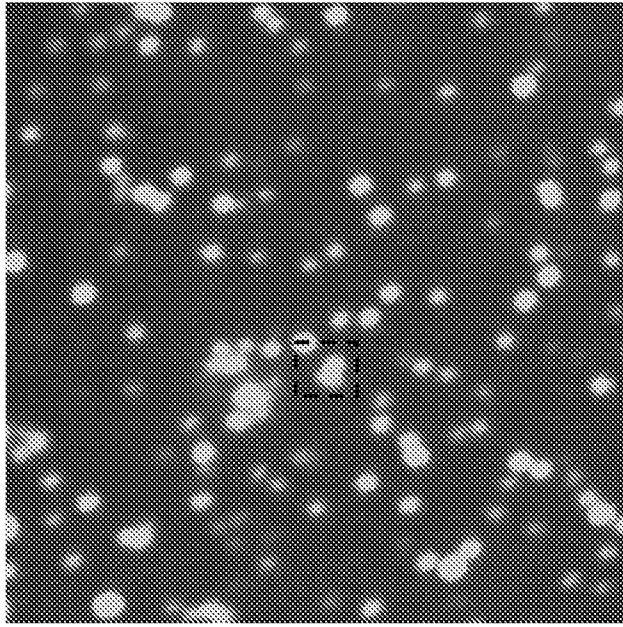


图 2

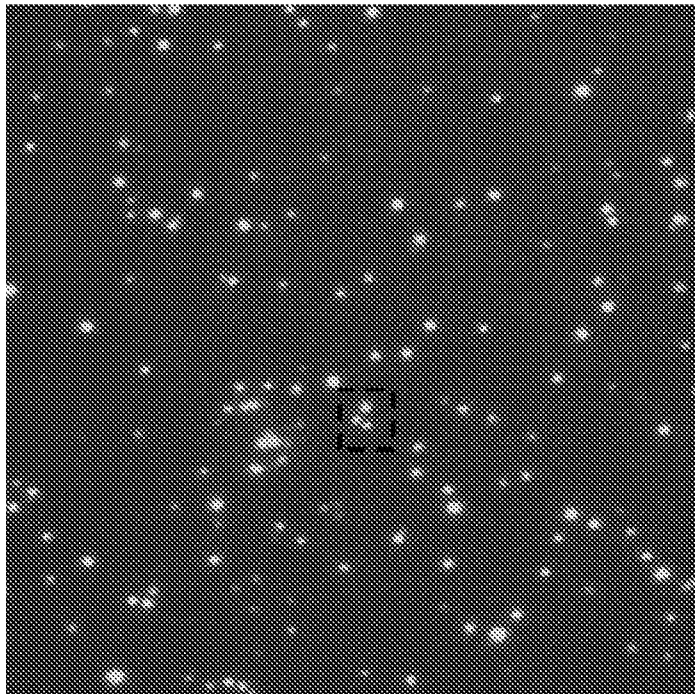


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/121206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B 21/06(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

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)

CNKI; CNPAT; WPI; EPODOC: 袁景和, 方晓红, 于建强, 中国科学院化学研究所, 分波, 分束, 分光, 延迟, 损耗, 荧光, 位相, 偏振, 显微, 辐射, 显微镜, 受激, 相位, 激光, YUAN JH, JHYUAN, microscope, STED, divid+, beam, delay+, polari+, phase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108957720 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 07 December 2018 (2018-12-07) claims 1-10	1-10
A	CN 106841149 A (WANG, FU) 13 June 2017 (2017-06-13) description, paragraphs [0040]-[0077], and figures 1-2	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 103257130 A (SUZHOU INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 21 August 2013 (2013-08-21) entire document	1-10
A	WO 2017174100 A1 (UNIVERSITÄT HEIDELBERG) 12 October 2017 (2017-10-12) 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

05 May 2019

Date of mailing of the international search report

29 May 2019

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/121206

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	108957720	A	07 December 2018	None	
CN	106841149	A	13 June 2017	None	
CN	103616330	A	05 March 2014	None	
CN	103257130	A	21 August 2013	CN 103257130	B 01 April 2015
WO	2017174100	A1	12 October 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/121206

A. 主题的分类 G02B 21/06 (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 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)) CNKI; CNPAT; WPI; EPDOC: 袁景和, 方晓红, 于建强, 中国科学院化学研究所, 分波, 分束, 分光, 延迟, 损耗, 荧光, 位相, 偏振, 显微, 辐射, 显微镜, 受激, 相位, 激光, YUAN JH, JHYUAN, microscope, STED, divid+, beam, delay+, polari+, phase																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 108957720 A (中国科学院化学研究所) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106841149 A (王富) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 说明书第[0040]-[0077]段、图1-2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103616330 A (中国科学院化学研究所) 2014年 3月 5日 (2014 - 03 - 05) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103257130 A (中国科学院苏州生物医学工程技术研究所) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017174100 A1 (UNIVERSITÄT HEIDELBERG) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 108957720 A (中国科学院化学研究所) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 权利要求1-10	1-10	A	CN 106841149 A (王富) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 说明书第[0040]-[0077]段、图1-2	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 103257130 A (中国科学院苏州生物医学工程技术研究所) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 全文	1-10	A	WO 2017174100 A1 (UNIVERSITÄT HEIDELBERG) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 108957720 A (中国科学院化学研究所) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 权利要求1-10	1-10																		
A	CN 106841149 A (王富) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 说明书第[0040]-[0077]段、图1-2	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 103257130 A (中国科学院苏州生物医学工程技术研究所) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 全文	1-10																		
A	WO 2017174100 A1 (UNIVERSITÄT HEIDELBERG) 2017年 10月 12日 (2017 - 10 - 12) 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 2019年 5月 5日		国际检索报告邮寄日期 2019年 5月 29日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 (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		授权官员 吴松江 电话号码 86-(10)-53962563																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/121206

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	108957720	A	2018年 12月 7日	无	
CN	106841149	A	2017年 6月 13日	无	
CN	103616330	A	2014年 3月 5日	无	
CN	103257130	A	2013年 8月 21日	CN 103257130	B 2015年 4月 1日
WO	2017174100	A1	2017年 10月 12日	无	