



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105510290 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201510975841. 9

(22) 申请日 2015. 12. 22

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路  
38 号

(72) 发明人 刘旭 刘秋兰 匡翠方 刘少聪

(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)

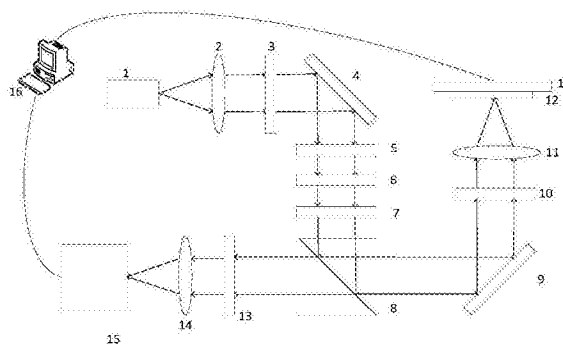
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

## (54) 发明名称

光子重组的非线性超分辨显微方法及装置

## (57) 摘要

本发明公开一种光子重组的非线性超分辨显微方法,包括步骤:1) 照明光束准直扩束后转换为线偏振光,所述线偏振光调制为圆偏振光聚焦到荧光样品上形成空心光斑照明;2) 荧光样品被激发出饱和荧光,并由多个光电探测器组成的探测器阵列对荧光成像;3) 对各探测器探测到的空心光斑做相应的平移后叠加,得到第一实心光斑的图像,实现对相应扫描点的成像。本发明还公开一种光子重组的非线性超分辨显微装置。本发明通过高功率激光照明以达到荧光的非线性效应,采用针孔探测器阵列取代传统共焦显微成像中放置于像面上的单个针孔探测器,利用光子重组技术,简化装置,提高成像速度。



1. 一种光子重组的非线性超分辨显微方法,其特征在于,包括步骤:

1)照明光束准直扩束后转换为线偏振光,所述线偏振光调制为圆偏振光聚焦到荧光样品上形成空心光斑照明;

2)荧光样品被激发出饱和荧光,并由多个光电探测器组成的探测器阵列对荧光成像;

3)对各探测器探测到的空心光斑做相应的平移后叠加,得到第一实心光斑的图像,实现对相应扫描点的成像。

2. 如权利要求1所述的非线性超分辨显微方法,其特征在于,通过在二维平面内移动样品或改变照明光束在荧光样品上聚焦位置,完成对所述荧光样品的二维扫描。

3. 如权利要求1所述的非线性超分辨显微方法,其特征在于,所述探测器阵列中具有处于荧光样品共轭点处的光电探测器,将步骤3)中实心光斑对应的有效点扩散函数减去加权后的所述光电探测器得到的空心光斑对应的有效点扩散函数,得到光斑更小的第二实心光斑,并以第二实心光斑对扫描点进行成像。

4. 如权利要求1所述的非线性超分辨显微方法,其特征在于,所述的照明光束的激光功率可使荧光产生非线性效应,达到饱和。

5. 一种光子重组的非线性超分辨显微装置,其特征在于,包括沿光路依次布置的激光器、透镜、偏振片、 $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板、四分之一波片和荧光样品,以及用于收集激发出饱和荧光的探测器阵列;

所述的探测器阵列由多个光电探测器组成;

还包括用于处理探测器阵列所采集信号的计算机。

6. 如权利要求5所述的非线性超分辨显微装置,其特征在于,所述的四分之一波片包括第一四分之一波片和第二四分之一波片。

7. 如权利要求6所述的非线性超分辨显微装置,其特征在于,所述的第一四分之一波片和第二四分之一波片之间设有用于调整入射光的线偏振方向的二分之一波片。

8. 如权利要求5所述的非线性超分辨显微装置,其特征在于,所述的照明光束的功率可使荧光产生非线性效应,达到饱和。

9. 如权利要求5所述的非线性超分辨显微装置,其特征在于,还包括用于荧光样品二维扫描的纳米平移台或二维扫描振镜。

10. 如权利要求5所述的非线性超分辨显微装置,其特征在于,所述探测器阵列中的各光电探测器呈矩形阵列分布。

## 光子重组的非线性超分辨显微方法及装置

### 技术领域

[0001] 本发明属于共聚焦显微领域,特别涉及一种光子重组的非线性超分辨显微方法及装置。

### 背景技术

[0002] 一直以来,传统的远场荧光显微技术由于衍射极限的存在,因此在纳米技术、材料、生物以及医学领域等的应用受到很大的限制。为了解决这一问题,自从上个世纪90年代开始,人们提出了很多超分辨显微方法。在这些所提出的方法中,荧光差分显微技术(FED)成为新近提出的方法中可以在不使用荧光标记的情况下分析生物样品。荧光差分显微术基于的是共聚焦显微成像技术,它是利用两个通过特定激发的光斑扫描得到的两张图像之差来获得分辨率的。即待分析的样品是分别被一个实心光斑接着被一个空心光斑照明,将两者以不同的比重进行相减运算即可重构出超分辨图像。实验结果显示,荧光差分显微在远场可以获取小于四分之一波长的分辨率并且具有较高的信噪比。

[0003] 然而,这种荧光差分显微术存在图像变形以及信息丢失的问题。在之前的系统中,空心光斑是通过采用一个0到 $2\pi$ 的涡旋位相板调制一个与之同向的圆偏光实现的。由于空心照明光斑的轮廓比实心光斑的要大得多,两者相减后将导致获得的有效点扩散函数出现负值旁瓣,而某些正值的强度可以通过负值强度来补偿,因此在图像重构的过程中,去除的负值强度将导致信息的丢失。这个问题的关键解决方法便是找到某种方法使产生的实心和空心光斑具有大致相等的尺寸。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种光子重组的非线性超分辨显微方法和装置,相对于其他超分辨成像显微镜,该装置是基于共聚焦显微镜,其结构简单,成像速度快,为生命科学和纳米技术提供了良好的研究手段。

[0005] 本发明通过光子重组以消除图像变形而实现超分辨成像的方法,这种方法被称为饱和光照明虚拟荧光差分超分辨显微术(svFED)。本显微术通过高功率激光照明以达到荧光的非线性效应,采用针孔探测器阵列取代传统共聚焦显微成像中放置于像面上的单个针孔探测器,利用光子重组技术,结合类似于荧光差分显微术(FED)的方法,仅仅扫描所获取的空心光斑而无需获取实心光斑,从而大大简化了实验装置并进一步提高了成像速度;同时由于不存在负值旁瓣,使系统消除了成像变形这一困扰。仿真结果显示光子重组的非线性超分辨率显微术相对于传统共聚焦显微术可提高至少39%。

[0006] 本发明的具体技术方案如下:

[0007] 本发明提供了一种光子重组的非线性超分辨显微方法,针对荧光样品包括以下步骤:

[0008] (1)激光器发出高功率照明光束,经第一透镜准直和扩束后得到准直扩束光束;所述准直扩束后的照明光束经第一偏振片后,得到线偏振光;

[0009] (2)所述线偏振光经第一反射镜反射后进入 $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板调制入射光的相位；所述被调制位相后的线偏光经第一四分之一波片后补偿了后面的二色镜和第二反射镜造成的位相差，使其在经第二反射镜反射后的出射光为准确的线偏光；所述位相差得到补偿的偏振光经半波片后得到改变了线偏振方向的出射光；所述出射光经二色镜反射后进入第二反射镜；所述经第二反射镜反射的反射光再经过第二四分之一波片后变成位相受到调制的圆偏振光；所述位相受到调制的圆偏光经过物镜后聚焦到位于所述物镜焦面处样品平面上形成空心光斑照明荧光样品；

[0010] (3)所述荧光样品被高功率的空心光斑照明后，在非线性的作用下，产生饱和效应，激发出饱和荧光；所述达到饱和效应的荧光被所述物镜收集，经所述第二四分之一波片后由所述第二反射镜反射后进入所述二色镜；所述荧光经所述二色镜透射后进入滤光片滤光后进入第二透镜；所述经滤光片滤光后的荧光由第二透镜会聚到由多个光电探测器组成的探测器阵列上参与成像；

[0011] (4)所述探测器阵列将光信号转换为电信号并传送给计算机；所述计算机将每个探测器探测到的空心光斑做相应的平移后叠加，得到实心光斑的图像，完成了对样品一个点的信息读入和处理；

[0012] (5)所述荧光样品放置于纳米移动平台上；所述样品平台与所述计算机相连，通过所述计算机的控制软件实现纳米移动平台的在二维平面的移动完成对所述荧光样品的二维扫描。

[0013] 本发明还提供了一种光子重组的非线性超分辨显微装置，针对荧光样品包括：

[0014] (1)高功率激光器，用于发出短波长高功率激光，实现对荧光样品的照明，利用荧光的非线性效应，以使其达到饱和从而激发饱和荧光；

[0015] (2)第一透镜，用于对激光器发出的激光进行准直和扩束；

[0016] (3)偏振片，用于使准直并扩束后的激光变成线偏振光；

[0017] (4)第一反射镜、第二反射镜，用于反射光路，使光路变得紧凑；

[0018] (5) $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板，用于调制入射光的相位，从而使所述激光在样品面聚焦时形成空心光斑；

[0019] (6)第一四分之一波片，用于补偿入射光经后面的二色镜和第二反射镜后带来的位相差，使其在经第二反射镜反射后为准确的线偏光；

[0020] (7)二分之一波片，用于调整入射光的线偏振方向；

[0021] (8)二色镜，用于使激光反射同时使被激发的荧光透射；

[0022] (9)第二四分之一波片，用于使相位受到调制的入射光变成圆偏振光；

[0023] (10)物镜，用于将相位受到 $0\sim 2\pi$ 调制的圆偏振光会聚到样品面上，收集荧光样品被激发后所发出的荧光；

[0024] (11)滤光片，用于滤除经所述样品面反射回来的激光，而仅使荧光样品发出的荧光通过参与成像；

[0025] (12)第二透镜，用于将所述荧光样品发出的荧光会聚到所述探测器阵列上；

[0026] (13)探测器阵列，由 $15\times 15$ 个带有针孔的光电探测器所组成的阵列，如图3所示的矩形阵列，用于将探测到的光信号转换为电信号并传送至计算机；

[0027] (14)纳米平移台，通过控制纳米位移平台完成对样品的二维平面扫描；

[0028] (15)计算机,用于处理探测器传送过来的信号,同时控制纳米移动平台的平动使其完成对样品的二维平面扫描。

[0029] 本发明的原理如下:

[0030] 本发明在传统共聚焦显微镜装置(如图1所示)的基础上,首先经准直扩束后的高功率激光光束入射到一偏振片后变成线偏光,线偏光再经过 $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板调制后经过物镜前的四分之一波片后形成位相受到调制的圆偏振光,再由物镜聚焦到位于其焦面上的样品平面后形成高强度空心光斑,激发光照明荧光样品后使其激发产生荧光。当激发光强度较小时,所激发的荧光强度与激发光强成正比,当激发光强 $I$ 超过某一临界值 $I_s$ 后,如果持续增加光强,荧光将产生非线性效应,即荧光的发射强度将保持恒定,产生荧光饱和现象。这是由于较强的激发光造成荧光分子的吸收截面减小,从而降低了分子实际捕获激发光光子的能力,即

$$[0031] \quad \sigma'_{cs} = \sigma_{cs} (1 + I/I_s)$$

[0032] 其中, $\sigma'_{cs}$ 为荧光分子的实际吸收截面, $\sigma_{cs} = 2\pi(\lambda/2\pi)^2(\gamma_r/\Gamma_{tot})$ 为荧光分子的吸收截面, $\Gamma_{tot}$ , $\gamma_r$ 和 $\lambda$ 分别为吸收总频率宽、自发辐射荧光率和激发光波长。此时的点扩散函数将产生变形,其峰值将被削平,如图5所示。这种变形后的点扩散函数在空间频域内包含更多的高频分量,从而可以探测物体更多的高频信息。物镜将收集到的饱和荧光经成像光路后,最终成像在探测器阵列上,则探测器阵列上所记录的光强为:

$$[0033] \quad I(\vec{r}; \vec{s}) = \int O(\vec{r} - \vec{r}') PSF_{eff}(\vec{r}'; \vec{s}) d\vec{r}'$$

[0034] 其中, $\vec{r}$ 代表样品上被扫描的位置矢量, $\vec{r}'$ 代表物空间上的物的位置矢量, $\vec{s}$ 代表探测器所在的位置矢量, $O$ 表示荧光样品发出的光强;有效点扩散函数为:

$$[0035] \quad PSF_{eff}(\vec{r}'; \vec{s}) = PSF_{exc}(\vec{r}') PSF_{det}(\vec{r}' + \vec{s})$$

[0036] 式中: $PSF_{exc}(\vec{r}')$ 代表激发点扩散函数, $PSF_{det}(\vec{r}')$ 代表探测点扩散函数,共轭焦点处的针孔探测器单元所对应的有效点扩散函数如图6所示。

[0037] 当探测器单元不是处在共轭焦点上时,该探测器单元所探测到的探测点扩散函数将发生平移,从而使有效点扩散函数的峰值产生平移,如图7(a)中的点虚线和线虚线所示分别表示距离共轭点探测器 $\pm 0.25\lambda$ 处所对应的有效点扩散函数。故假如直接将每个探测器单元所获得的有效点扩散函数加起来,则所获得的有效点扩散函数将产生较大的轮廓,从而与未采用针孔探测器的共焦显微一样降低了分辨率。所以,在已知探测器阵列中每个探测单元的实际位置时,将每个探测器单元所对应的有效点扩散函数作一定的平移,如图7(b)点虚线和线虚线所示,然后再相加,这一过程被称为光子重组,用公式表示即:

$$[0038] \quad I_{pr}(\vec{r}) = \sum_{\vec{s}} I(\vec{r} - q\vec{s}; \vec{s})$$

[0039] 其中 $q$ 称为平移因子,采用卷积的形式写出该光强即为:

$$[0040] \quad I_{pr}(\vec{r}) = \int O(\vec{r} - \vec{r}') PSF_{pr}(\vec{r}') d\vec{r}'$$

[0041] 其中,

$$[0042] \quad PSF_{pr}(\vec{r}') = \sum_{\vec{s}} PSF_{exc}(\vec{r}' - q\vec{s}) PSF_{det}(\vec{r}' + (1-q)\vec{s})$$

[0043] 由于探测器阵列中的每个探测单元所获得的有效点扩散函数的空心暗斑位置都

与共轭焦点处探测器单元所得到的暗斑位置重合,当对探测器阵列中的每个探测单元所对应的有效点扩散函数作光子重组后,中心暗斑位置处将被光子填充,从而使作光子重组后的有效点扩散函数变成一个中心较周围强度稍低的实心光斑,其有效点扩散函数如图8所示。

[0044] 那么利用与荧光差分(FED)一样的原理,将光子重组所获得的实心光斑对应的有效点扩散函数减去一定比例的处于荧光样品共轭点处探测单元所得到的空心光斑对应的有效点扩散函数即可获得一个光斑更小的实心光斑,所对应的有效点扩散函数如图9所示。对于处于共轭点的探测单元所得到空心光斑的光强分布为:

$$[0045] \quad \begin{aligned} I(\vec{r};0) &= \int O(\vec{r}-\vec{r}')PSF_{eff}(\vec{r}';0)d\vec{r}' \\ &= \int O(\vec{r}-\vec{r}')PSF_{hollow}(\vec{r}')d\vec{r}' \end{aligned}$$

[0046] 其中,

$$[0047] \quad PSF_{hollow}(\vec{r}') = PSF_{eff}(\vec{r}';0) = PSF_{exc}(\vec{r}')PSF_{det}(\vec{r}')$$

[0048] 则重构图像后的光强为:

$$[0049] \quad I_{rec}(\vec{r}) = I_{pr}(\vec{r}) - p \times I(\vec{r};0)$$

[0050] 其中,p为减数因子。采用卷积形式可以写成:

$$[0051] \quad I_{rec}(\vec{r}) = \int O(\vec{r}-\vec{r}')PSF_{rec}(\vec{r}')d\vec{r}'$$

[0052] 其中,

$$[0053] \quad \begin{aligned} PSF_{rec}(\vec{r}') &= PSF_{pr}(\vec{r}') - p \times PSF_{hollow}(\vec{r}') \\ &= \sum_{\vec{s}} PSF_{exc}(\vec{r}'-q\vec{s})PSF_{det}(\vec{r}'+(1-q)\vec{s}) \\ &\quad - p \times PSF_{exc}(\vec{r}')PSF_{det}(\vec{r}') \end{aligned}$$

[0054] 适当选择平移因子q和减数因子p可以获得一个半高全宽很小的重构点扩散函数。如此便完成了对单个物点的图像读入和处理过程。当对样品作二维扫描时,便可实现对样品的二维高分辨成像。

[0055] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0056] (1)相对于原有的共聚焦显微镜,通过采用探测器阵列取代原有的单个针孔探测器,使获得的图像具有更高的信噪比。

[0057] (2)相对于原有的荧光差分显微成像(FED),采用光子重组的方法使获得的具有更高的横向分辨率,也使图像具有更高的保真度。

[0058] (3)相对于原有的荧光差分显微成像(FED),仅需获得空心光斑而无需获取实心光斑,使装置更加简单和更高的成像速度。

## 附图说明

[0059] 图1为传统的共聚焦显微镜装置示意图;

[0060] 图2为一种纳米移动平台移动实现样品扫描的光子重组的非线性超分辨显微装置示意图;

[0061] 图3为针孔探测器阵列的横截面示意图;

[0062] 图4为一种通过振镜扫描实现对样品扫描的光子重组的非线性超分辨显微装置示意图；

[0063] 图5为针孔探测器阵列中位于坐标(0,0)处中心探测单元所对应的激发点扩散函数示意图；

[0064] 图6为针孔探测器阵列中位于坐标(0,0)处中心探测单元所获得的有效点扩散函数的示意图；

[0065] 图7(a)实线为探测器阵列中位于坐标(0,0)处中心探测单元探测到的有效点扩散函数示意图；图7(a)点虚线为探测器阵列中位于坐标(0.25 $\lambda$ ,0)处中心探测单元探测到的有效点扩散函数示意图；图7(a)线虚线为探测器阵列中位于坐标(-0.25 $\lambda$ ,0)处中心探测单元探测到的有效点扩散函数示意图；图7(b)实线为探测器阵列中位于坐标(0,0)处中心探测单元探测到的有效点扩散函数示意图；点虚线和线虚线分别为将图7(a)位于(0.25 $\lambda$ ,0)和(-0.25 $\lambda$ ,0)的探测器单元得到的有效点扩散函数作平移后所得到的有效点扩散函数示意图；

[0066] 图8为将探测器阵列上每个探测单元探测到的有效点扩散函数作光子重组后得到的有效点扩散函数示意图；

[0067] 图9为利用光子重组后得到的实心光斑对应的有效点扩散减去空心点光斑对应的有效点扩散得到一个半高全宽更小的实心光斑对应的有效点扩散的过程示意图，其中，图9(a)为将探测器阵列上每个探测单元探测到的光斑作光子重组后得到的实心光斑对应的有效点扩散函数示意图；图9(b)为空心光斑对应的有效点扩散函数示意图；图9(c)为相减后半高全宽更小的实心光斑对应的点扩散函数示意图。

## 具体实施方式

[0068] 下面结合实施例和附图来详细说明本发明，但本发明并不限于此。

[0069] 实施例1

[0070] 如图2所示，利用纳米移动平台实现样品扫描的非线性超分辨显微装置，包括高功率激光器1，第一透镜2，偏振片3，第一反射镜4，0~2 $\pi$ 涡旋位相板5，第一四分之一波片6，半波片7，二色镜8，第二反射镜9，第二四分之一波片10，物镜11，样品12，滤光片13，第二透镜14，探测器阵列15，计算机16和纳米移动平台17。

[0071] 采用图2所示的装置实现的非线性差分显微方法，其过程如下：

[0072] (1)激光器1发出高强度照明光，经第一透镜2准直并扩束；准直扩束后的照明光经偏振片3后变成线偏振光；

[0073] (2)线偏振光经第一反射镜4反射后进入0~2 $\pi$ 涡旋位相板5进行相位调制；被调制位相后的线偏光经第一四分之一波片6后补偿了后面的二色镜8和第二反射镜9造成的位相差，使其在经第二反射镜反射后的出射光为准确的线偏光；位相差得到补偿的偏振光经半波片7后得到改变了线偏振方向的出射光；然后再由二色镜8反射后被第二反射镜9反射进入第二四分之一波片10，出射光变成相位得到调制的圆偏振光；圆偏振光经过物镜11聚焦后得到一个高强度空心光斑聚焦到荧光样品12上；

[0074] (3)高强度空心光斑的激光照明荧光样品12后，使荧光产生非线性效应，达到饱和后激发样品产生饱和荧光，再经过物镜11收集后经过第二反射镜9入射到二色镜8上；二色

镜8透射使荧光透射;透射的荧光经滤光片13滤光后滤除样品反射的激光及其他杂散光,仅使荧光出射;出射的荧光经第二透镜14会聚后,聚焦到探测器阵列15上;探测器阵列15将光信号转变成电信号,并将电信号传送至计算机16;

[0075] (4)计算机16将探测器阵列15中的每个探测器单元所获得的信号作相应的图像处理得到一个物点所对应的图像;

[0076] (5)样品12所在的纳米移动平台17与计算机16相连,通过计算机16来控制纳米移动平台17使样品12移动完成二维扫描,得到样品对应的二维图像。

[0077] 实施例2

[0078] 如图4所示,一种由振镜扫描实现样品扫描的非线性超分辨显微装置,包括高功率激光器1,第一透镜2,偏振片3,第一反射镜4, $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板5,第一四分之一波片6,半波片7,二色镜8,二维扫描振镜18,第二四分之一波片10,物镜11,样品12,滤光片13,第二透镜14,探测器阵列15和计算机16。

[0079] 采用图2所示的装置实现非线性超分辨显微方法,其过程如下:

[0080] (1)激光器1发出高强度照明光,经第一透镜2准直并扩束;准直扩束后的照明光经偏振片3后变成线偏振光;

[0081] (2)线偏振光经第一反射镜4反射后进入 $0\sim 2\pi$ 涡旋位相板5进行相位调制;被调制位相后的线偏光经第一四分之一波片6后补偿了后面的二色镜8和二维扫描振镜18造成的位相差,使其在经二维扫描振镜18反射后的出射光为准确的线偏光;位相差得到补偿的偏振光经半波片7后得到改变了线偏振方向的出射光;然后再由二色镜8反射后进入如图中虚线框内所示的二维扫描振镜18,二维扫描振镜18可以对入射光在二维方向上进行扫描;由二维扫描振镜18出射的激光进入第二四分之一波片10,出射光变成相位得到调制的圆偏振光;圆偏振光经过物镜11聚焦后得到一个空心光斑聚焦到荧光样品12上;

[0082] (3)高强度空心光斑的激光照明荧光样品12后,使荧光产生非线性效应,达到饱和效应,激发样品产生饱和荧光,再经过物镜11收集后经过二维扫描振镜18入射到二色镜8上;二色镜8透射使荧光透射;透射的荧光经滤光片13滤光后滤除样品反射的激光及其他杂散光,仅使荧光出射;出射的荧光经第二透镜14会聚后,聚焦到探测器阵列15上;探测器阵列15将光信号转变成电信号,并将电信号传送至计算机16;

[0083] (4)计算机16将探测器阵列15中的每个探测器单元所获得的信号作相应的图像处理得到一个物点所对应的图像;

[0084] (5)样品12由与计算机16相连的二维扫描振镜18进行二维扫描,通过计算机16来控制二维扫描振镜18的在二维方向进行转动,使由二维扫描振镜18出射的光在二维方向上实现对样品12的扫描,最终得到样品对应的二维图像。



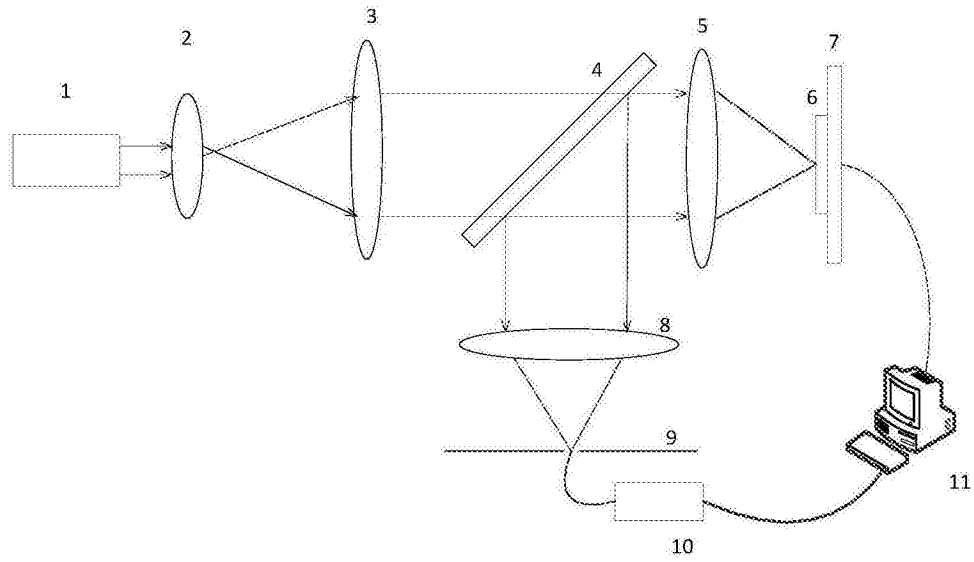


图1

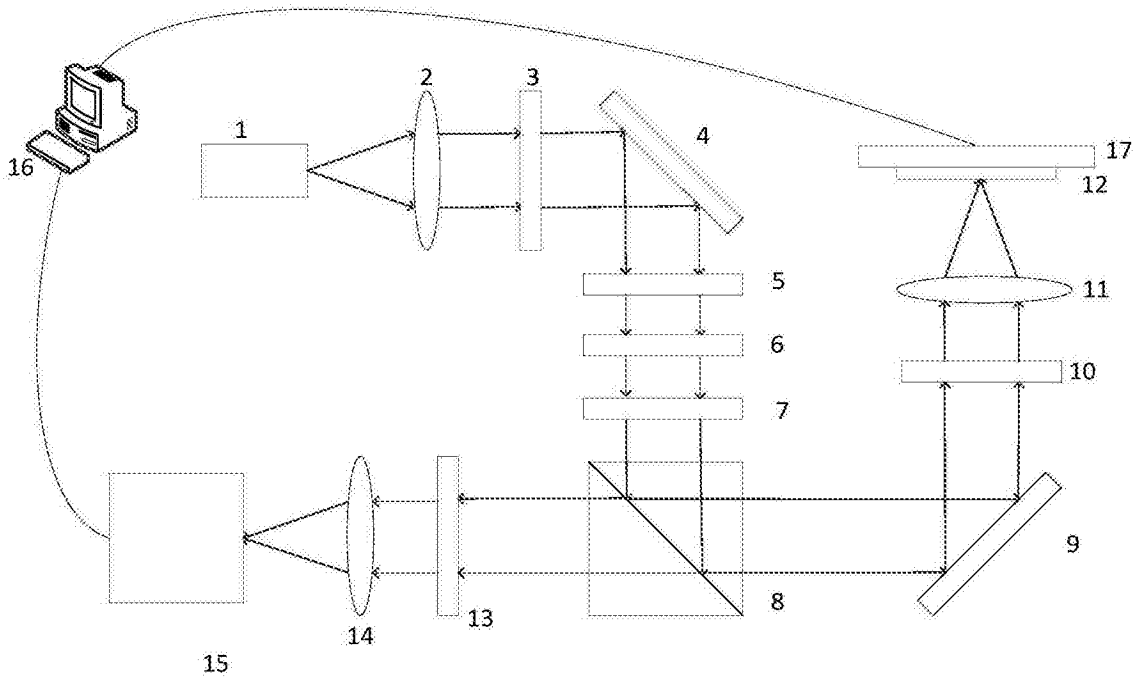


图2

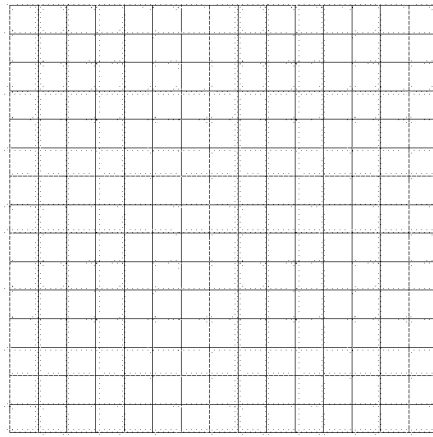


图3

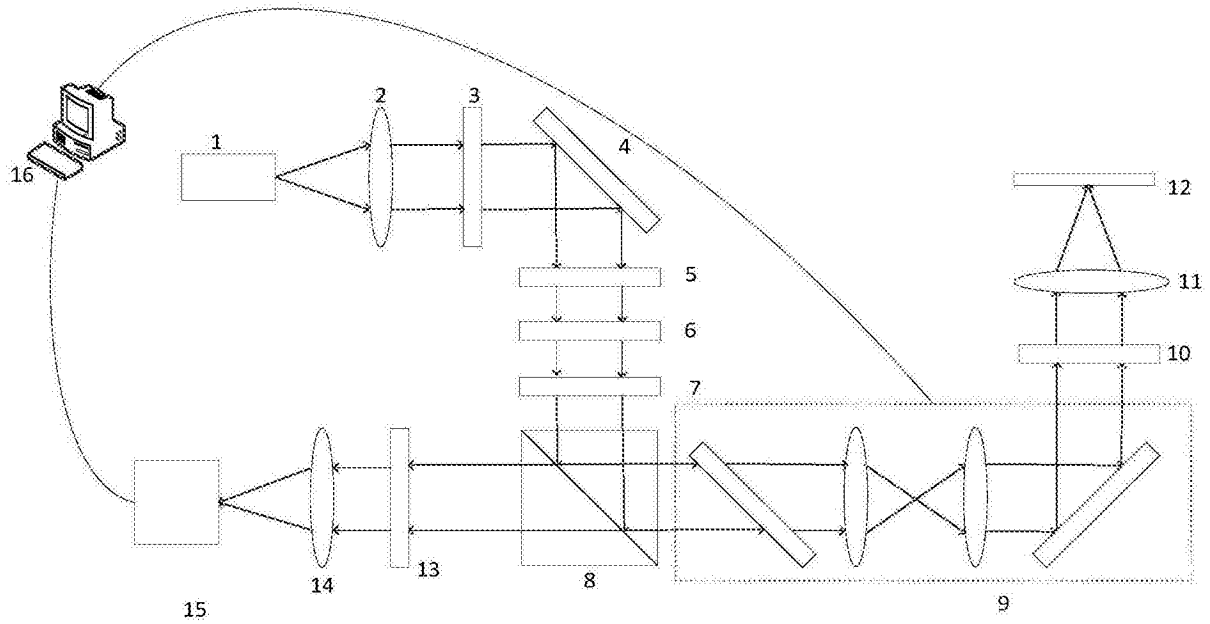


图4

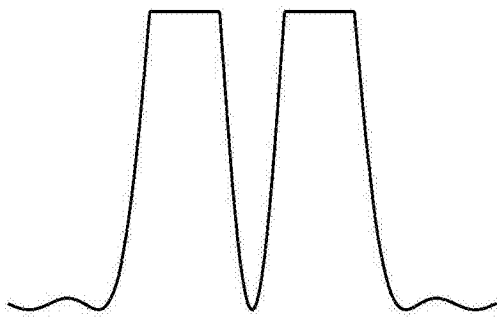


图5

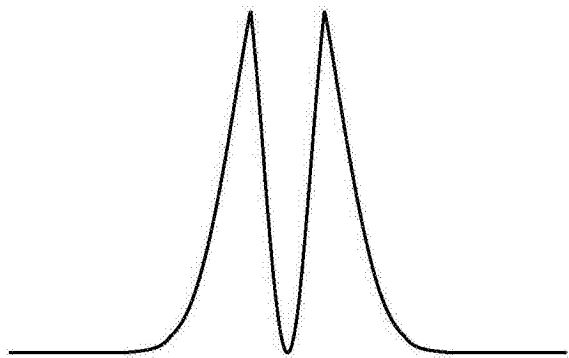


图6

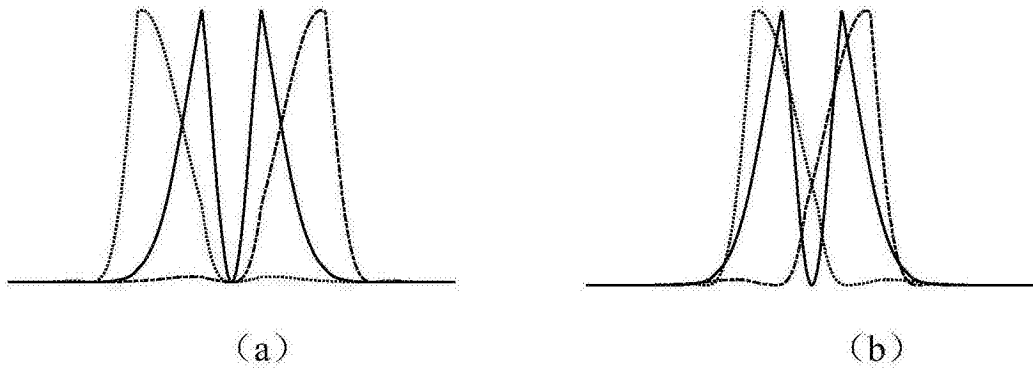


图7

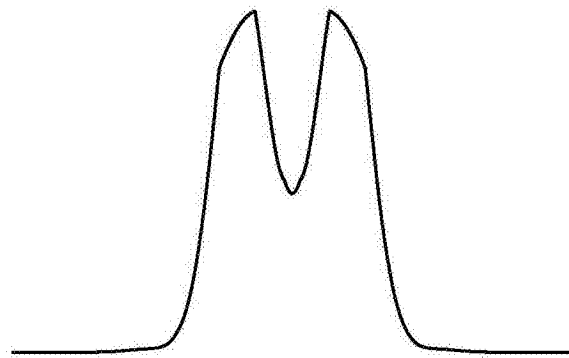


图8

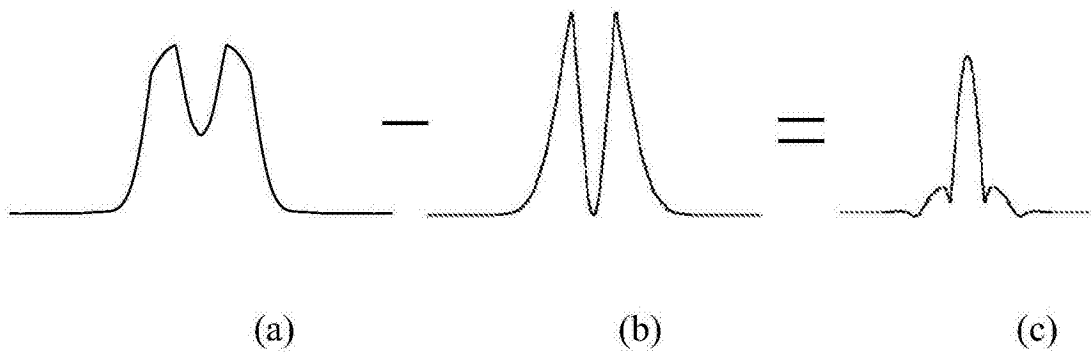


图9