



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109313330 B

(45) 授权公告日 2021.06.15

(21) 申请号 201780028957.9

(22) 申请日 2017.04.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109313330 A

(43) 申请公布日 2019.02.05

(30) 优先权数据
1606268.9 2016.04.12 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2017/051034 2017.04.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/178823 EN 2017.10.19

(73) 专利权人 特罗姆瑟大学- 挪威北极圈大学
地址 挪威特罗姆瑟

(72) 发明人 B·S·阿卢瓦利亚
M·舒特佩尔茨

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 刘爱勤 黄纶伟

(51) Int.Cl.
G02B 21/16 (2006.01)
G02B 21/36 (2006.01)
G02B 27/56 (2006.01)
G02B 27/58 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2003058440 A1, 2003.03.27
CN 102928384 A, 2013.02.13
CN 102879916 A, 2013.01.16

审查员 陈翊杭

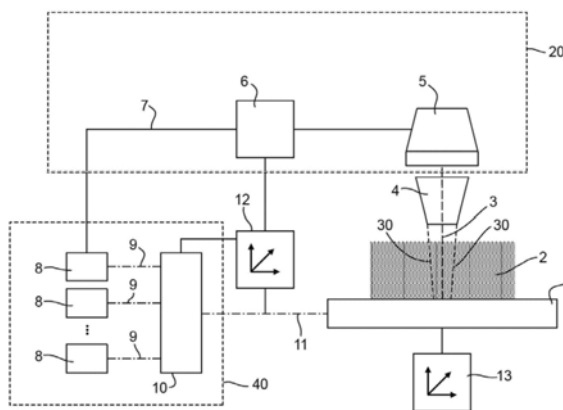
权利要求书4页 说明书13页 附图6页

(54) 发明名称

执行对样本的超分辨率荧光显微技术成像的装置和方法

(57) 摘要

本发明提供一种执行对样本的超分辨率荧光显微技术成像的装置和方法。一种用于执行对样本超分辨率成像的装置,包括:物镜(4),其在前向视场(30)内收集从所述样本(2)发出的光;处理装置(20),其利用所收集的光执行对所述样本的超分辨率成像;波导组件(1),其布置成(i)从所述视场外部接收输入光、以及(ii)使用在所述波导组件内的全内反射将激发光导向到所述样本上;以及电子光路控制系统(40),其使得所述输入光:在第一时间,在所述波导组件内遵循与第一光学模式对应的第一光路;以及在第二时间,在波导组件内遵循与第二光学模式对应的第二光路,其中,第二时间不同于第一时间,以及第二光学模式不同于第一光学模式。



1. 一种用于执行对样本的超分辨率荧光显微技术成像的装置,所述装置包括:
具有前向视场的物镜,所述物镜布置成在所述前向视场内收集从所述样本发出的光;
处理装置,所述处理装置布置成利用所收集的光执行对所述样本的超分辨率荧光显微技术成像;
波导组件,所述波导组件位于所述物镜之前且布置成:(i)从所述视场外部接收输入光,以及(ii)使用在所述波导组件内的全内反射将激发光导向到所述样本上;以及
电子光路控制系统,所述电子光路控制系统布置成:
使得第一波长的输入光在第一时间、在所述波导组件内遵循与第一光学模式对应的第一光路,以用第一激发图案照射所述样本;以及
使得所述第一波长的输入光在第二时间、在所述波导组件内遵循与第二光学模式对应的第二光路,其中,所述第二时间不同于所述第一时间,且其中,所述第二光学模式不同于所述第一光学模式,以用不同于所述第一激发图案的第二激发图案照射所述样本。
2. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述第一时间和所述第二时间在用于所述超分辨率荧光显微技术成像的第一帧的曝光时段内,所述装置配置成在该第一帧期间提供比仅由所述第一激发图案提供的所述样本的平均激发更均匀的所述样本的平均激发。
3. 根据权利要求2所述的装置,其中,所述电子光路控制系统布置成使得所述输入光在所述第一帧内多次在所述第一光路与所述第二光路之间循环。
4. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述第一时间在用于所述超分辨率荧光显微技术成像的第一帧的曝光时段内,且所述第二时间在用于所述超分辨率荧光显微技术成像的第二帧的曝光时段内,所述第二帧不同于所述第一帧。
5. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述电子光路控制系统布置成使得所述输入光在不同的相应时间遵循多于两个的光路,其中在所述波导组件内,每个光路对应于不同的相应的光学模式,以用两个以上不同的相应的激发图案照射所述样本。
6. 根据权利要求1或2所述的装置,还包括光注入设备,所述光注入设备布置成将输入光注入所述波导组件,其中,所述电子光路控制系统包括致动器,所述致动器布置成使所述光注入设备相对于所述波导组件移动,从而在所述第一时间与所述第二时间之间改变所述输入光进入所述波导组件时所处的位置或角度。
7. 根据权利要求6所述的装置,其中,所述致动器包括振动压电级。
8. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述电子光路控制系统包括用于改变所述输入光的偏振或相位以在所述第一时间具有第一值且在所述第二时间具有不同于所述第一值的第二值的装置。
9. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述电子光路控制系统包括温度变化元件,所述温度变化元件布置成改变所述波导组件内的温度以在所述第一时间具有第一值且在所述第二时间具有不同于所述第一值的第二值,从而改变所述波导组件内的折射率。
10. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述处理装置配置成使用在持续时间在0.5毫秒与30秒之间的曝光时段上收集的光来生成一图像帧。
11. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,针对所收集的光中的至少一个波长,所述超分辨率荧光显微技术成像的成像分辨率比所述物镜在所述波长处的分辨率更高。
12. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述超分辨率荧光显微技术成像包括单分子

定位方法。

13. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述超分辨率荧光显微技术成像包括基于波动光场的超分辨率法。

14. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述超分辨率荧光显微技术成像选自包括如下项的组:随机光学重建显微技术(STORM);直接随机光学重建显微技术(dSTORM)、光激活定位显微技术(PALM);超分辨率光学波动成像(SOFI);和基于熵的超分辨率成像(ESI)。

15. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件布置成从输出面输出所述激发光,所述输出面至少部分地在所述物镜的所述视场内。

16. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件布置成将所述输入光沿着光路导向到所述样本,其中,所述光路的宽度在朝向所述样本的方向上增大。

17. 根据权利要求16所述的装置,其中,所述宽度在绝热条件下增大。

18. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件包括肋状物或条状物波导结构。

19. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述电子光路控制系统和所述波导组件布置成使得该波导组件仅接收具有所述第一波长的输入光。

20. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件布置成仅将由消散场组成的激发光导向到所述样本上。

21. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件包括第一核心区域,并且其中,所述第一光路和所述第二光路是该第一核心区域内的不同路径。

22. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件包括第一核心区域和与所述第一核心区域接触的第一包覆区域,所述第一核心区域具有高于所述第一包覆区域的折射率且布置成沿着一个或多个光路引导光穿过所述波导组件,其中,所述第一包覆区域被构形为限定用于保持所述样本的样本井。

23. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件布置成从所述波导组件的边缘面输出所述激发光。

24. 根据权利要求1或2所述的装置,包括布置成聚焦所述激发光的光栅。

25. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件布置成将所述输入光沿着光路导向到所述样本,所述光路在至少一个维度上成锥形以形成用于聚焦所述激发光的透镜。

26. 根据权利要求25所述的装置,其中,所述透镜为轴棱锥透镜。

27. 根据权利要求23所述的装置,其中,所述波导组件包括:

第一核心区域和与所述第一核心区域接触的第一包覆区域,所述第一核心区域具有高于所述第一包覆区域的折射率且布置成限定穿过所述波导组件的第一核心光路;以及

第二核心区域和与所述第二核心区域接触的第二包覆区域,所述第二核心区域具有高于所述第二包覆区域的折射率且布置成限定穿过所述波导组件的第二核心光路,

其中,所述第一核心区域布置成将激发光导向到所述样本的第一区域上,且其中,所述第二核心区域布置成将激发光导向到所述样本的第二区域上,所述第二区域不同于所述第一区域。

28. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,所述波导组件包括单片集成到基板上的波导结构。

29. 一种用于执行对样本的超分辨率荧光显微技术成像的方法, 所述样本至少部分地位于物镜的前向视场内, 所述方法包括:

接收从所述视场外部进入位于所述物镜之前的波导组件中的输入光;

导引第一波长的输入光在第一时间、在所述波导组件内遵循与第一光学模式对应的第一光路, 以用第一激发图案照射所述样本;

导引所述第一波长的输入光在第二时间、在所述波导组件内遵循与第二光学模式对应的第二光路, 其中, 所述第二时间不同于所述第一时间, 且其中, 所述第二光学模式不同于所述第一光学模式, 以用不同于所述第一激发图案的第二激发图案照射所述样本;

使用在所述波导组件内的全内反射将激发光导向到所述样本上;

利用所述物镜从所述样本收集荧光; 以及

利用所收集的光来生成超分辨率荧光显微技术图像。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中, 所述第一时间和所述第二时间在用于所述超分辨率荧光显微技术图像的第一帧的曝光时段内, 所述第一激发图案和所述第二激发图案在该第一帧期间提供比仅由所述第一激发图案提供的所述样本的平均激发更均匀的所述样本的平均激发。

31. 根据权利要求30所述的方法, 还包括: 在所述第一帧内多次在所述第一光路与所述第二光路之间循环。

32. 根据权利要求29所述的方法, 其中, 所述第一时间在用于所述超分辨率荧光显微技术图像的第一帧的曝光时段内, 且所述第二时间在用于所述超分辨率荧光显微技术图像的第二帧的曝光时段内, 所述第二帧不同于所述第一帧。

33. 根据权利要求29或30所述的方法, 包括: 导引输入光在不同的相应时间遵循多于两个的光路, 其中在所述波导组件内, 每个光路对应于不同的相应的光学模式, 以用两个以上不同的相应的激发图案照射所述样本。

34. 根据权利要求29或30所述的方法, 还包括: 在所述第一时间按第一位置或第一角度将光注入所述波导组件中; 以及在所述第二时间按第二位置或第二角度将光注入所述波导组件中, 所述第二位置或第二角度不同于所述第一位置或第一角度。

35. 根据权利要求29或30所述的方法, 还包括: 在所述第一时间以第一相位或偏振将光注入所述波导组件中; 以及在所述第二时间以第二相位或偏振将光注入所述波导组件中, 所述第二相位或偏振不同于所述第一相位或偏振。

36. 根据权利要求29或30所述的方法, 还包括: 在所述第一时间与所述第二时间之间改变所述波导组件的温度, 从而改变所述波导组件内的折射率。

37. 根据权利要求29或30所述的方法, 包括: 使用在持续时间在0.5毫秒与30秒之间的曝光时段上收集的光来生成用于生成所述超分辨率荧光显微技术图像的一帧。

38. 根据权利要求29或30所述的方法, 其中, 针对所收集的光中的至少一个波长, 所述超分辨率荧光显微技术图像的分辨率比所述物镜在所述波长处的分辨率更高。

39. 根据权利要求29或30所述的方法, 包括: 使用单分子定位方法来生成所述超分辨率荧光显微技术图像。

40. 根据权利要求29或30所述的方法, 包括: 使用基于波动光场的超分辨率方法来生成所述超分辨率荧光显微技术图像。

41. 根据权利要求29或30所述的方法,包括:使用随机光学重建显微技术(STORM);或使用直接随机光学重建显微技术(dSTORM)、或使用光激活定位显微技术(PALM);或使用超分辨率光学波动成像(SOFI);或使用基于熵的超分辨率成像(ESI)来生成所述超分辨率荧光显微技术图像。

42. 根据权利要求29或30所述的方法,其中,将来自所述波导组件的激发光导向到所述样本上包括:将激发光从所述波导组件的输出面导向到所述样本上,所述输出面至少部分地在所述物镜的所述视场内。

43. 根据权利要求29或30所述的方法,还包括:将所述输入光沿着光路导向到所述样本,所述光路的宽度在朝向所述样本的方向上增大。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中,所述宽度在绝热条件下增大。

45. 根据权利要求29或30所述的方法,还包括:沿着所述波导组件中的肋状物或条状物波导结构导引所述第一波长的输入光。

46. 根据权利要求29或30所述的方法,其中,所述波导组件包括单片集成到基板上的波导结构。

47. 根据权利要求29或30所述的方法,其中,所接收的输入光仅具有等于所述第一波长的单个波长。

48. 根据权利要求29或30所述的方法,其中,将来自所述波导组件的激发光导向到所述样本上包括:将激发光从所述波导组件的边缘面导向到所述样本上。

49. 根据权利要求29或30所述的方法,还包括:将来自所述波导组件的所述激发光聚焦到所述样本上。

50. 根据权利要求29或30所述的方法,还包括:将激发光导向到所述样本的第一区域上且将激发光导向到所述样本的第二区域上,其中,通过分离区域将所述第二区域与所述第一区域分离,激发光不被导向到所述分离区域中。

51. 根据权利要求29或30所述的方法,其中,将来自所述波导组件的激发光导向到所述样本上包括:仅将由消散场组成的激发光导向到所述样本上。

52. 根据权利要求29或30所述的方法,还包括:将所述样本保持在所述波导组件中限定的样本井中。

执行对样本的超分辨率荧光显微技术成像的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于执行对样本的超分辨率成像的装置和方法。更具体地但非排它地,本发明涉及用于执行对样本的直接随机光学重建显微技术(direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy,dSTORM)成像。

背景技术

[0002] 在组织学、细胞生物学和相关领域内,使用光学显微镜来观察生物样本,诸如细胞。然而,由于光的衍射极限,因此光学显微镜的分辨能力受限制。该限制将可见光显微技术的分辨率约束到大约200nm至300nm。为了克服该限制,在本领域中开发了几种技术,称为“纳米显微技术”、“超分辨率成像”或“超分辨率显微技术”。

[0003] 这些超分辨率成像技术允许以低至20nm至50nm的分辨率对生物样本进行成像。它们基于处理从已附着到生物样本或嵌入在生物样本内的光可切换荧光团或量子点标记发射的光。这类超分辨率技术的已知示例包括随机光学重建显微技术(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy,STORM)、直接随机光学重建显微技术(dSTORM)、光激活定位显微技术(Photoactivated Localization Microscopy,PALM)、超分辨率光学波动成像(Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging,SOFI)和基于熵的超分辨率成像(Entropy-Based Super-Resolution Imaging,ESI)。

[0004] 图1示出用于超分辨率成像(诸如dSTORM成像)的示例性现有技术布置。该布置包括第一激光光源140、第二光源145、第一分束器160、第二分束器150、在相关波长处分辨率大约为250nm的物镜110(例如,高-NA 60x物镜)、样本170、和CCD或sCMOS检测器190。该布置还包括将来自第一激光光源140的光导向第一分束器160且将来自第二激光光源145的光导向第一分束器160的部件。第一分束器160将从第一激光光源140和第二激光光源145接收的光组合以形成激发光束130并将该激发光束130导向第二分束器150。第二分束器150将激发光束130导向物镜110。

[0005] 为了对样本中感兴趣的特定区域成像,将激发光束导向样本170的感兴趣区域上,从而激发该区域中的荧光团。当执行dSTORM时,可以使用两个不同波长,如本领域技术人员将所知。当样本区域中的荧光团发光时,该光被收集且处理,以便生成感兴趣区域的图像。这通过如下方式来实现:将物镜110聚焦到样本170上的感兴趣区域上,从而将激发光束130导向到感兴趣区域上且从而可以收集从感兴趣区域发出的光。第二分束器150用于过滤从激发光170收集的光120以及将所收集的光120导向到CCD检测器190上。当然可以执行进一步过滤。计算机(未示出)从CCD检测器190接收数据并通过高斯拟合(或另一已知方法)处理该数据以按大于物镜的250nm分辨率的精确度确定荧光团的位置。

[0006] 伴随目前通常用于超分辨率成像的装置的问题是,该装置可能是昂贵的、庞大的、且安装和操作起来繁琐的。

[0007] 超分辨率成像布置通常使用具有高数值孔径(Numerical Aperture,NA)的物镜照射样本,要么利用消散场(全内反射荧光)、要么利用高度倾斜且压合的光学片(Highly-

Inclined and Laminated Optical sheet,HILO)。

[0008] 然而,具有高数值孔径(NA)的物镜是昂贵的。它们也具有受限的视场(Field-Of-View,FOV),这约束可从样本收集的荧光的视场。该受限的视场的尺寸大约为50微米到250微米,其小于典型生物样本(例如细胞培养物和集落或组织)的尺寸。这意味着在成像期间可能需要将显微镜相对于样本重新定位且对齐,从而获得整个生物样本的完整亚分辨率图像。当对活细胞培养物进行成像时,这特别棘手,因为在细胞培养物的第二部分在视场之外时不可能同时对涉及细胞培养物的第一部分和细胞培养物的第二部分的运动进行成像。此外,需要复杂的图像处理来整合一起获取的亚分辨率图像以形成整个生物样本的完整亚分辨率图像。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供多方面解决这些缺点的用于执行超分辨率成像的装置和方法。

[0010] 从第一方面,本发明提供一种用于执行对样本的超分辨率成像的装置,所述装置包括:

[0011] 具有前向视场的物镜,所述物镜布置成在所述前向视场内收集从所述样本发出的光;

[0012] 处理装置,所述处理装置布置成利用所收集的光执行对所述样本的超分辨率成像;以及

[0013] 波导组件,所述波导组件位于所述物镜之前且布置成(i)从所述视场外部接收输入光、以及(ii)使用在所述波导组件内的全内反射将激发光导向到所述样本上。

[0014] 从第二方面,本发明提供一种用于执行对样本的超分辨率成像的方法,所述样本至少部分地位于物镜的前向视场内,所述方法包括:

[0015] 接收从所述视场外部进入位于所述物镜之前的波导组件中的输入光;

[0016] 使用在所述波导组件内的全内反射将激发光导向到所述样本上;

[0017] 利用所述物镜从所述样本收集光;以及

[0018] 利用所收集的光执行超分辨率成像。

[0019] 因此,本领域的技术人员将看出,根据本发明,光由波导组件(其通过全内反射引导光)供应给样本、而非由物镜供应。该物镜因此可以被优化用以从样本收集光,而非要求同一物镜既将激发光供应给样本、又收集从样本发射的光。

[0020] 使用波导激发样本以进行超分辨率成像提供多个令人惊讶的优势,包括:允许使用具有比在超分辨率成像中通常使用的数值孔径更低的数值孔径的成像物镜、致使样本的视场更宽且设备成本更低。它也避免在传统超分辨率设置中涉及的大部分对准复杂度,这是因为该波导组件可以直接将激发光供应到样本上,而无需附加组件,诸如分束器。

[0021] 该波导组件优选地从光源(诸如激光器)接收输入光,该光源优选地位于物镜的视场之外。该波导组件可以通过空气或通过某种其它介质(诸如连接到波导组件的光纤电缆)接收输入光。输入光的波长可以随着时间而改变,例如,通过在多个不同波长之间的临时多路复用。输入光优选地不经过物镜。激发光也优选地不经过物镜。物镜优选地具有大于0.4且优选地小于1.49的数值孔径。

[0022] 物镜优选地具有光轴,该光轴与穿过波导的光路的方向不平行。在一些实施方式中,物镜的光轴基本上垂直于穿过波导的光路的方向、或垂直于波导的平坦层。

[0023] 可以执行任何合适的超分辨率成像技术。超分辨率成像优选地使得,针对所收集的光中的至少一个波长,成像分辨率比物镜在该波长处的分辨率更高。当然,物镜的分辨率将受限于透镜的衍射极限。所收集的光优选地包括由样本发射的荧光;超分辨率成像优选地为荧光显微技术。超分辨率成像可以包括单分子定位方法或基于波动光场的超分辨率技术。该超分辨率成像可以选自包括如下项的组:随机光学重建显微技术 (STORM);直接随机光学重建显微技术 (dSTORM)、光激活定位显微技术 (PALM);超分辨率光学波动成像 (SOFI);和基于熵的超分辨率成像 (ESI)。一组优选实施方式使用dSTORM。

[0024] 波导组件可以采取任何合适的形式。在一些实施方式中,该波导组件包括一个或多个平坦层。该波导组件可以包括平板波导结构、肋状波导结构、条状波导结构、或多核激发波导结构。在一组优选实施方式中,波导包括单片集成到基板上的波导结构,该基板可以为平面基板。该基板可以为硅。该基板优选地具有小于200微米(诸如160微米至170微米)的最大厚度。在一些实施方式中,该基板可以为透明的,使得能够通过该基板从样本收集光。

[0025] 该波导组件优选地布置成从输出面输出激发光,该输出面至少部分地在物镜的视场内。该输出面优选地为平坦的。该输出面可以平行于光在波导组件内采用的路径的方向(例如,当作为消散场将激发光导向到样本上时)或该输出面可以倾斜于(优选地垂直于)光在波导组件内采用的路径的方向(例如,当作为光束或光片将激发光从输出面导向到样本上时)。

[0026] 波导组件可以布置成将输入光沿着光路导向到样本,该光路的宽度在朝向样本的方向上、在至少一个维度上增大。这在利用激发光(间接地利用消散场或直接地)照射样本的更大区域时会很有用。该宽度优选地在绝热条件下增大,从而可以保持波导的单一模式状况(这可能对于特定超分辨率成像技术很有用)。

[0027] 在一组实施方式中,波导组件布置成仅将由消散场组成的激发光导向到样本上。该样本优选地与波导组件接触。该波导组件可以包括第一核心区域和与该第一核心区域接触的第一包覆区域,该第一核心区域具有高于第一包覆区域的折射率且布置成限定穿过波导的第一核心光路,其中,该第一包覆区域被构形为限定用于保持样本的样本井。

[0028] 该样本井可以包括一个或多个壁,特别地,4个平面侧壁。该样本井可以涂覆有生物可兼容层,例如,包括BSA(牛血清白蛋白)、PEG(聚乙二醇)或PPL(聚L-赖氨酸)分子。

[0029] 在另一组实施方式中,波导组件布置成从该波导组件的边缘面输出激发光。样本可以与边缘面接触,或在边缘面与样本之间可具有介质,诸如空气间隙和/或细胞缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS))。再者,波导组件可以限定用于保持样本的样本井。该样本井可以包括一个或多个侧壁。这些侧壁中的至少一者可以包括至少一个波导层。边缘面可以形成样本井的一个侧壁的至少部分。相应地,可以在与物镜的光轴横切(优选地垂直)的方向上照射接收的样本。该边缘面可以涂覆有生物可兼容层,例如,包括BSA(牛血清白蛋白)、PEG(聚乙二醇)或PPL(聚L-赖氨酸)分子。

[0030] 这样的装置有利地使荧光团能够超出样本的表面区域(例如,深入样本1微米以上)而被激发。

[0031] 相比于已知的基于消散场的照射技术(其中,激发功率相对较低,通常小于总输入

光功率的大约10%)，这样的装置针对给定激光源还允许以相对较高的功率有效地激发荧光团。

[0032] 来自边缘面的激发光优选地被构形为光片。该光片优选地在与物镜的前向视场的主方向横切(优选地垂直)的平面上与样本交叉。通过生成光片,优选地,可以照射样本的整个横截面。该光也可以被形成为在横切平面(同时平行于物镜的光轴)上发散的光束,或被形成为具有均匀发散度的光束。

[0033] 从边缘面发出的光束或光片的厚度优选地小于500纳米、1000纳米或2000纳米。为了促进此,可以将波导层沉积为透明材料的透光薄膜。该薄膜可以具有小于1微米的厚度。

[0034] 边缘面可以放置成侧对表面区域,样本可放置到该表面区域上。

[0035] 可以至少在平行于物镜的光轴的平面上控制来自边缘面的激发光的发散度。优选地,至少在该平面上,发散度被控制成小于自然发散度,这是由于边缘面的形状和横截面,该边缘面优选地为平坦的。这类控制可以由边缘面自身或波导层的极为接近边缘面的区域来提供。

[0036] 光束也可以朝向样本内的焦点或线焦点汇聚,优选地在光轴上。可以同时建立在平行于光轴方向的平面上的汇聚和横切光轴的发散。

[0037] 波导组件可以包括柱状透镜、静态光栅、或布置成聚焦激发光的声光栅。这可以实现激发样本的部分上的更大控制。出于相同原因,波导组件可以布置成将输入光沿着光路导向到样本,该光路在至少一个维度上成锥形以形成用于聚焦激发光的透镜。透镜可以为轴棱锥透镜。可以使用轴棱锥透镜来生成伪贝塞尔光束,该光束的中央核心对于特定距离来说为薄的且非衍射的。锥形化可以旋转地对称(例如圆锥形的),但是它优选地为楔形的或角锥状的,因为这类形状可以易于制作,例如使用光刻。透镜优选地位于输出面。

[0038] 利用已知的超分辨率技术的限制是,样本的仅一个小区域可以被激发且因此被成像。在本发明的实施方式中,波导组件可以包括:

[0039] 第一核心区域和与所述第一核心区域接触的第一包覆区域,所述第一核心区域具有高于所述第一包覆区域的折射率且布置成限定穿过所述波导组件的第一核心光路;以及

[0040] 第二核心区域和与所述第二核心区域接触的第二包覆区域,所述第二核心区域具有高于所述第二包覆区域的折射率且布置成限定穿过所述波导组件的第二核心光路,

[0041] 其中,所述第一核心区域布置成将激发光导向到所述样本的第一区域上,且其中,所述第二核心区域布置成将激发光导向到所述样本的第二区域上,所述第二区域不同于所述第一区域。

[0042] 采用该方式,可以通过在各自区域中选择性地激发荧光团而在多个区域(例如,穿过样本的平行切片)中对样本成像。当然,波导组件可以包括另外的核心区域和包覆区域,从而能够将光导向到样本的三个、四个或更多个不同区域上。相应地,对于处理装置来说可以生成样本的三维(3D)模型。

[0043] 波导组件可以包括用于保持样本的井或其它保持装置。

[0044] 该装置可以包括电子光路控制系统,该电子光路控制系统布置成使得输入光在第一时间、在波导组件内遵循第一光路,以及在不同于第一时间的第二时间、在波导组件内遵循不同于第一光路的第二光路。优选地,输入光在第二时间不遵循第一光路。优选地,输入光在第一时间不遵循第二光路。在多核心实施方式中,这些第一光路和第二光路可以分别

对应于第一核心光路和第二核心光路；可替代地，它们可以为单一核心内的不同路径。第一时间和第二时间可以均在单帧曝光时段内，即，用于单针的曝光时间（例如，当使用单分子定位技术（诸如STORM或dSTORM）时）。可替代地，第一时间可以在用于第一帧的曝光时段内，以及第二时间可以在用于不同于第一帧的第二帧的曝光时段内（例如，当使用基于波动光场的技术（诸如ESI或SOFI）时）。在布置成利用消散场激发样本的实施方式中，这已被发现是特别有利的，这是因为在波导组件内，第一光路和第二光路可以对应于不同的相应的光学模式。消散场的图案因此在光学模式之间将不同。相比于一直使用仅一个模式，当使用单分子定位技术时，通过在一个单帧曝光时段内生成多个这类图案，可以在该曝光时段上实现样本的更均匀的平均激发。如果在单帧曝光时段上未均匀地激发样本，形成的超分辨率图像可以丢失重要细节或某些产物，诸如条纹图案。可替代地，通过在不同的相应的帧的曝光时段中生成不同图案，可以实现在照明中的合适波动，以供与基于波动光场的超分辨率技术一起使用。在该情况下，每个图案（模式）优选地在给定的单帧曝光时段期间是恒定的。

[0045] 处理装置优选地配置成使用在曝光时段上收集的光来生成一帧，该曝光时段的持续时间大约为1毫秒、5毫秒、10毫秒、100毫秒、1000毫秒或10000毫秒。可以将帧存储在处理装置的存储器中（例如作为阵列），如本领域的技术人员将所熟悉的。

[0046] 该处理装置优选地配置成生成多个帧（例如，100、1000、10000或更多）以及使用这些生成一个或多个超分辨率输出图像或动画（例如，使用传统的超分辨率技术，如上所述）。可以将这类输出图像或动画存储在存储器中和/或显示在显示器（诸如计算机监控器）上。这些帧优选地全部具有持续时间相同的曝光时段。

[0047] 该处理装置可以包括任何合适的处理部件，诸如如下项中的任何一者或多者：微处理器、微控制器、ASIC、FPGA、DSP、存储器和包含软件指令的存储器。它可以包括本地设备（诸如台式PC）或远程设备（诸如服务器），或它可以被分布，诸如包括服务器的云。从其它方面，本发明包括软件和承载软件的有形介质，其包括用于指示处理设备执行本文中所描述的步骤中的任何步骤的指令，例如包括：控制光源和/或控制光注入设备和/或使用从样本收集的光来生成超分辨率图像。

[0048] 光路控制系统可以布置成使得输入光在用于单帧的曝光时段内多次（例如，2次、10次、100次或更多次）在第一光路与第二光路（以及可选地，另外的光路）之间循环。当例如在片上dSTORM试验中使用特定超分辨率技术时，这是有益的，它使多个模式能够在单一图像帧内被激发。对于基于波动光场的超分辨率技术，反而可优选的是每个图像帧具有一个模式。

[0049] 该装置可以包括光注入设备，该光注入设备布置成将输入光注入波导组件（诸如光纤电缆、透镜或镜子）中。光注入设备可以受处理装置控制。光路控制系统可以包括致动器，该致动器布置成在单帧曝光时段期间或从一个单帧曝光时段到下一个单帧曝光时段使光注入设备相对于波导组件移动，从而改变输入光进入波导组件（例如，在波导组件的进入面）时所处的位置或角度。移动透镜部分或整个物镜可以及时导致不同平行偏移、不同入射角、或不同聚焦位置。致动器可以包括可连接到光注入设备的压电致动器或振动电机，诸如振动压电级。致动器可以包括声光栅，该声光栅可以在平行于输入光的传播方向的平面上（例如在用于将光耦合到波导组件中的波导的上表面、下表面或侧表面上）延伸；通过改变调制信号的频率，可以产生不同光栅和不同挠曲度，因此相对于波导组件的进入面移动输

入光束。

[0050] 光路控制系统可以包括用于在单帧曝光时段期间或从一个单帧曝光时段到下一个单帧曝光时段改变输入光的偏振、相位或波长中的一者或多者的装置。它例如可以包括可旋转的偏振器、或相位变化设备,诸如在不同位置上具有不同厚度以提供变化的光路长度的旋转圆盘或可移动平板。光路控制系统可以包括温度变化元件,该温度变化元件布置成在单帧曝光时段期间或从一个单帧曝光时段到下一个单帧曝光时段改变波导组件内的温度,从而改变波导组件内的折射率。

[0051] 申请人也已想出从消散场实现变化的激发场的另一方式,这不需要在单帧曝光时段内或之间对输入光进行改变。这通过导引光同时遵循穿过波导组件的第一光路和穿过波导组件的第二光路来实现,该第一光路对应于波导组件的第一光学模式且该第二光路对应于波导组件的第二光学模式,从而使得第一光学模式和第二光学模式干扰。该干扰使得消散激发光的强度在成像发生时调制。已发现这类照射很好地适合于基于波动照射的超分辨率分析,诸如SOFI和ESI。

[0052] 本文中所描述的任何方面或实施方式的特征可以(只要适当)应用于本文中所描述的任何其它方面或实施方式。在参考不同实施方式或多组实施方式的情况下,应当理解,这些不一定有区别,而是可以重叠。

附图说明

[0053] 下面将仅通过示例方式、参照附图描述本发明的特定优选实施方式,附图中:

[0054] 图1为现有技术的用于执行荧光显微技术的装置的示意图;

[0055] 图2为根据本发明的用于执行荧光显微技术的装置的示意图;

[0056] 图3为根据本发明的波导组件的横截面;

[0057] 图4为图3的波导组件的平面视图;

[0058] 图5a、图5b和图5c为根据本发明的波导组件的平面视图;

[0059] 图6a、图6b和图6c为全部根据本发明的三个替选波导结构的横截面轮廓;

[0060] 图7为根据本发明的多核心波导组件在波导一端的侧轮廓;以及

[0061] 图8a和图8b为根据本发明的在两个波导组件中的不同边缘面布置的平面视图。

具体实施方式

[0062] 图2示出用于执行荧光显微技术的装置,该装置包括物镜4,诸如Plan N 20x/0.40lympus™物镜,该物镜4具有面向波导组件1的前向视场30。该装置还包括:光注入设备40,该光注入设备40光耦合到波导组件1的输入面;以及样本2,该样本2置于物镜4的前向视场30内的波导组件1上。该装置还包括处理装置20,该处理装置20配置成接收且处理由物镜4在前向视场30内收集的光。

[0063] 本示例中的样本为嵌入有荧光团的有机细胞,但是当然可使用其它样本。

[0064] 光注入设备40包括用于将光注入波导组件1中的物镜10、致动器和三个光源8。来自三个光源的三个光束的波长分别为405纳米、488纳米和647纳米。物镜10接收这三个光束并聚焦光束以将其注入波导组件1中。注入的光形成用于波导的输入光。具有一个或多个不同波长的输入光实现样本2的单分子定位超分辨率成像,例如使用dSTORM。

[0065] 致动器12可以使物镜10相对于波导组件1移动,从而将光在不同位置上注入波导组件1中,和/或以不同角度注入波导组件1中。通过改变将光注入波导组件1中所处的位置和/或角度能够使光注入设备40与波导组件1之间的光耦合被细调。另外,它允许在成像过程中以不同位置和/或角度将光注入波导组件中,以改变光路,沿着该光路,注入的光沿着波导组件传播。注入的光在波导组件内传播所采用的光路对应于由波导组件1的光学模式限定的光路。

[0066] 如图3和图4所示,波导组件1包括形成在基板201上的波导结构。波导结构的层包括夹在上包覆层204与下包覆层202之间的光学导向层203(在本文中有时被称为核心层203)。下包覆层202布置在基板201与核心层203的第一面208之间。上包覆层204布置在核心层203的第二面209上,该第二面209与核心层203的第一面208相对。核心层203具有比包覆层更高的折射率且将注入的光导向到波导组件1中。

[0067] 在本示例中,波导结构为平板波导(如图3和图6a所示),但是如下文所陈述,波导组件可以代替地包括肋状物(例如,如图6b所示)、条状物(例如,如图6c所示)、或多核心激发(例如,如图7所示)波导结构。

[0068] 图3、图4和图6a的平板波导结构优选地形成在硅或透明基板上且包括五氧化二钽Ta₂O₅或氮化硅Si₃N₄的薄核心层203(优选地小于500nm)、氧化硅SiO₂的下包覆层202、和氧化硅SiO₂的上包覆层204。上包覆层和下包覆层可以可替换地为折射率密切匹配用于生物成像的样本介质的折射率(即 $n=1.38$)的材料。

[0069] 注入波导组件1的光沿着波导组件1传播,其中,注入的光的一部分在波导核心区域之外传播。该部分光被称为消散场。可以通过制作薄波导且通过在核心与包覆之间使用高折射率对比度来增大消散场中的强度。因此,优选的是具有用于核心的高折射率材料和用于包覆的较低折射率材料(理想地与样本的介质匹配)。另外,核心和包覆材料应当具备低吸收损失和低自动荧光。

[0070] 波导组件1还包括停靠件,其被制造用以保持样本206,使得它与在波导结构中传播的消散场重叠。与消散场的重叠确保将注入的光的至少一部分导向到停靠件内包含的样本206上。导向到样本206上的光在本文中被称为激发光。波导结构的面(将激发光从该面导向到样本206上)在本文中被称为输出面。

[0071] 在平板波导结构中,停靠件包括在上包覆层204中的间隙,该间隙限定与消散场重叠的样本井207。该样本井207至少部分地沿着波导组件1的长度和宽度延伸。

[0072] 处理装置20包括用于检测来自样本的光的荧光检测设备5(诸如CCD或sCMOS相机)和电子控制单元6,该电子控制单元6用于控制荧光检测设备5且使用已知的超分辨率成像技术处理检测到的光以生成样本206的超分辨率图像。

[0073] 在超分辨率单帧曝光时段的开端(例如持续10毫秒),致动器12将光注入设备40放在第一光注入位置上。在第一光注入位置上,光注入设备将第一输入光注入波导组件1中以在平板波导结构内遵循第一光路(或第一组光路)。遵循一个或多个第一光路的注入光的至少一部分作为第一消散场在核心区域203之外传播且被导向到样本井207中。导向到样本井207中的第一消散光形成第一激发图案。第一激发图案在大约1毫秒的时段内照射样本井207中的样本206。

[0074] 在从超分辨率单帧曝光时段的开端起的1毫秒之后,致动器12将光注入设备40放

在第二光注入位置上。在第二光注入位置上,光注入设备将第二输入光注入波导组件1中以及在平板波导结构内遵循第二光路(或第二组光路)。遵循一个或多个第二光路的注入光的至少一部分作为第二消散场在核心区域203之外传播且被导向到样本井207中。导向到样本井207中的第二消散场形成第二激发图案。第二激发图案在大约1毫秒的时段内照射样本井207中的样本206。

[0075] 在从超分辨率单帧曝光时段的开端起2毫秒之后,致动器12将光注入设备40放在第三光注入位置上。在第三光注入位置上,光注入设备将第三输入光注入波导组件1中以及在平板波导结构内遵循第三光路(或第三组光路)。遵循一个或多个第三光路的注入光的至少一部分作为第三消散场在核心区域203之外传播且被导向到样本井207中。导向到样本井207中的第三消散场形成第三激发图案。第三激发图案在大约1毫秒的时段内照射样本井207中的样本206。

[0076] 然后致动器12将光注入设备40放回到第一光注入位置且该过程循环,直到10毫秒的曝光时段结束。

[0077] 照射样本206的第一、第二和第三激发图案刺激样本中的荧光团以发荧光且发射光。物镜4在整个单帧曝光时段期间收集从荧光团发射的光。由物镜4在单帧曝光时段期间收集的光被导向到荧光检测设备5。荧光检测设备5将接收到的光检测为电信号并将电信号发送到电子控制单元6。该电子控制单元6使用dSTORM单分子定位方法处理电信号以生成样本的第一图像。

[0078] 该电子控制单元6可以包括任何合适处理部件,诸如微处理器、微控制器、ASIC、FPGA、DSP、存储器和包含软件指令的存储器中的一者或多者;它可以包括单一设备,诸如台式PC,或它可以被分布,诸如远程服务器或服务器的云。

[0079] 样本的第一图像对应于dSTORM超分辨率成像技术中的第一帧。在生成第一帧之后,该装置生成样本的另外大约10000帧。在如下帧中的每帧中,在下一个单帧曝光时段内利用依次三个激发图案的周期再次照射样本,等等。

[0080] 电子控制单元6将第一帧和后续每帧记录在存储器中。在所有帧都已被捕获之后,电子控制单元6使用已知的dSTORM超分辨率成像技术、基于所有帧产生样本的最终超分辨率图像。

[0081] 发明人已发现,在单帧曝光时段期间改变激发光相对于样本206的重叠和方向提供了激发光在单帧曝光时段期间的更好均匀性。特别地,他们已发现,相比于静态光路,变化的光路使与样本重叠的激发光的强度平均化。激发光的更好均匀性导致质量更好的超分辨率图像,其具有更好的分辨率、更少的产物、更鲜明的对比度、和更好的强度范围。在一些情况下,基于波导的超分辨率成像在无该特征的情况下是完全不可能的,这是因为照射图案太不均匀(例如,具有规格类似于可视化结构的条状物)。

[0082] 在本示例中,将理解,与样本井207重叠的核心层203的第二面209形成输出面,来自该输出面的光被导向到样本上。

[0083] 第一、第二和第三光路(或多组路径)可以对应于由波导结构的不同光学模式限定的不同路径。例如,第一光路可以对应于平板波导结构的基础模式,以及第二光路可以对应于平板波导结构的第一阶模式。作为另一示例,第一组光路可以对应于平板波导结构的第一组模式(例如基础模式和第一命令模式),以及第二组光路可以对应于平板波导结构的第

二组模式(例如第一命令模式和第二命令模式)。

[0084] 图2因此示出了用于执行荧光显微技术的设置,诸如例如dSTORM。波导组件1支撑置于物镜4的视场内的样本2。波导组件1形成波导结构,光被注入该波导结构中。通过全反射将注入光沿着波导结构导向,且注入光的至少一部分作为消散光场传播。波导将注入光的至少一部分导向到样本2上。

[0085] 可选地,控制物镜10相对于波导组件1的移动的致动器12受电子控制器控制。例如,该致动器可以为受Thorlabs™的压电控制器BPC303控制的压电级。

[0086] 可替代地,代替使用物镜10将光注入波导组件1中,光注入设备40可以利用光纤11将光注入波导组件1中。例如,光注入设备40可以包括光纤耦合器10,该光纤耦合器10布置成从每个光源接收光束,以及光纤11光耦合在光纤耦合器10与波导组件1之间。光纤耦合器多路复用沿着光纤11的不同光束并将光聚焦到波导组件1中。可选地,在本示例中,光注入设备40可以包括与光纤11连接的致动器12,且如利用与物镜10连接的致动器的布置,致动器12可以使光纤11的位置和/或角度相对于波导组件1移动。

[0087] 附加地或可替代地,波导组件1可以连接到致动器13,以调整光注入设备40相对于波导组件1的位置。相应地,根据本公开的示例,可以使用该致动器将输入光注入波导组件1中,以在单帧曝光时段期间、在波导组件内遵循第一光路和/或第二光路。致动器13例如可以为振动压电级。

[0088] 可选地,光注入设备40可以包括任何数量的光源8或单一光源8,诸如单一波长或可调谐波长的光源。每个光源可以发射适合于激发荧光团的光,例如在可见光谱(400纳米至800纳米)或近IR(800纳米至1500纳米)内。另外,每个光源可以为激光光源,诸如固态激光器、光纤激光器或二极管激光器。附加地或可替代地,每个光源8可以为LED光源或适合于超分辨率显微技术的任何其它光源。

[0089] 附加地或可替代地,输入光可以具有单一波长或多个波长。例如,输入光可以包括647纳米光和488纳米光(对于荧光成像来说,两个最常用的波长)。

[0090] 可替代地,光注入设备可以同时第一、第二和第三输入光注入波导组件1中,以分别遵循第一、第二和第三光路(或光路组)。在本示例中,第一、第二和第三光路对应于由波导组件1中的波导结构的第一、第二和第三光学模式限定的光路。第一、第二和第三光学模式彼此均不同。同时使第一、第二和第三光学模式传播穿过波导组件1使得第一、第二和第三光学模式彼此干扰。在本领域中,不同传播模式的干扰被称为模式跳变。使第一、第二和第三模式跳变调制从波导组件1导向到样本上的激发光。发明人已发现,以该方式调制激发光使得能够基于适用于临时改变激发光的超分辨率成像技术对样本成像。

[0091] 可选地,可以利用在波导结构中传播的任何数量的光学模式执行模式跳变,以调制激发光。例如,仅利用同时在波导结构中传播的第一光学模式和第二光学模式执行模式跳变。

[0092] 可选地,可以对包括量子点而非荧光团的样本执行亚分辨率成像。在本示例中,导向到样本上的激发光刺激量子点发射用于超分辨率成像的光。

[0093] 可选地,处理装置20还可以包括一个或多个滤波器(诸如带通滤波器),以过滤由物镜4收集的光。例如,该滤波器可以配置成阻断对应于激发光的光且传输对应于由荧光团发射的光的光。

[0094] 图6a、图6b和图6c示出在三个不同的可能波导结构中的层的横截面。

[0095] 图6a示出上文已参照图3和图4所描述的平板波导结构200中的层的、但是在远离样本井206的区域中的横截面。

[0096] 图6b示出可选变型,其中,通过使脊部刻蚀到波导结构的上包覆层204中以限定肋状波导结构300而提供侧面光学导向件。在肋状波导结构300中,脊部被部分地刻蚀成穿过上包覆层204、但不穿过核心层203。在肋状波导结构300中的侧面光学导向件增大在核心层203之外导向的消散场的强度。相应地,相比于平板波导结构200,增大重叠在肋状波导结构300中限定的样本井207的消散场的强度,从而增大与样本206交互的激发光的强度。增大激发光的强度产生更强的荧光。

[0097] 图6c示出另一变型,其中,通过使脊部另外刻蚀穿过波导结构的核心层203以限定条状波导结构400而提供导向到样本206上的消散场的强度的进一步增强。在条状波导结构400中的侧面光学导向件增大在核心层203之外导向的消散场的强度。相应地,相比于平板波导结构200和肋状波导结构300,增大重叠在条状波导结构400中限定的样本井207的消散场的强度,从而增大与样本206交互的激发光的强度。增大激发光的强度产生更强的荧光。

[0098] 通常,肋状波导降低由于侧壁粗糙度减小而造成的传播损失。肋状波导也将波导参数(诸如厚度和宽度)扩展用于单模式状况。然而,在条状波导内部更严格地限制光,运行更剧烈的弯曲、转动以及减小波导结构的封装。另外,对于在两种波导内部相似的导向能力,条状波导在消散场中将具有比肋状波导更高的强度。此外,通常对于给定的波导参数,条状波导将支持比肋状波导更多的模式,除非使这两种波导为单一模式。根据成像条件,可以使用平板、肋状、条状波导几何结构。如果需要在消散场中的更高能力,优选的是使用肋状波导(因为传播损失针对用于生物成像的可见波长来说显著增大);然而,对于基于波动光场的成像技术,条状波导是优选的,因为它支持更多模式。然而,可以将平板、肋状或条状波导结构全部用于任何超分辨率成像技术。

[0099] 平板波导结构200、肋状波导结构300、条状波导结构400的宽度范围优选地从1微米到100微米。

[0100] 可选地,肋状或条状波导结构可以沿着其长度变宽,以增大在上包覆层204中限定的样本井207的宽度。增大波导结构的宽度加宽沿着波导结构传播的可见光场的宽度,且允许用于保持样本206的更大样本井207。更大样本井207结合更宽激发光场有利地允许对更大样本区域成像,用于亚分辨率成像。

[0101] 图5a、图5b、图5c示出三个替选布置的各自平面视图,其中,在肋状波导结构300的上包覆层204中形成样本井207。在图5a和图5b中,肋状波导结构300的宽度在绝热条件下增大,以限定更大样本区域207且加宽沿着波导结构传播的可见光场的宽度。发明人已发现,在绝热条件下增大波导结构的宽度可以保持在绝热区域450之前的区域中传播的可见光的光学模式轮廓。例如,绝热区域450保持在绝热结构之前的波导结构中传播的可见光的基础模式轮廓。

[0102] 可选地,在样本井207区域之后,可以使肋状或条状波导结构的宽度渐缩,如在图5b中的区域460处所示。

[0103] 可以使用标准半导体制作技术来制作包括平板波导结构的波导组件1。例如,平板波导结构可以通过如下方式来制作:第一,将SiO₂的下层202溅射到硅基板上;第二,将

Ta2O5的核心层203溅射到SiO2的下层202上;然后第三,将SiO2的上层204溅射到核心层203上。可以通过使用光刻法和湿蚀刻限定上层204中的间隙来形成样本井207。

[0104] 可以通过离子束研磨上包覆层204以限定脊部来制作包括肋状波导结构的波导组件1。上包覆层204优选地被刻蚀到核心层203之上200nm的深度。离子束研磨有利地减小波导的侧壁粗糙度且因此波导结构内的光学传播损失。

[0105] 可选地,可以将波导结构和样本井207单片地集成在波导组件1的基板201上。

[0106] 可选地,波导组件1可以包括多个波导结构。每个波导结构可以接收输入光且将激发光导向到样本井207中。附加地或可替代地,波导结构可以包括多个波导结构,以及每个波导结构可以接收输入光且将激发光导向到该多个波导结构中的一者或多者中。

[0107] 在将样本206放到样本井207中之前,可以通过在70°C下将波导组件1浸入5% (v/v) Hellmanex™ (来自Sigma Aldrich™) 中达10分钟来清洁波导组件1。随后,可以通过将其首先浸入去离子水中、其次浸入异丙醇(来自Sigma Aldrich™) 以及再次浸入去离子水中来去除Hellmanex™。

[0108] 样本井207可以包含布置在波导核心层203上的生物层205,如图3所示。该生物层防止样本中的荧光团非特异结合到波导核心层203且可以包括BSA或PEG。此外,生物层205促进直接在样本井207内培养样本。生物层205是优选的但不是强制的。而且,选择生物层的厚度从而确保消散场仍与样本井207中的样本重叠,且该厚度通常小于20nm。

[0109] 可选地,可以按照标准协议(诸如例如用于将细胞附着到玻璃盖片的已知协议)直接在波导组件1的样本井207中制备样本。

[0110] 在条状波导结构400中的脊部410的侧壁可以限定用于保持样本206的停靠件207。即,脊部的侧壁可以限定样本井207。在本示例中,它是在脊部的导向到样本206上且与样本井207重叠的一侧、在核心层203之外传播的消散场。根据本公开,将样本井布置成紧挨着脊部的侧壁也得益于与样本交互的、强度增大的消散场。换言之,波导结构的侧壁可以支撑样本且由此形成用于接收样本的样本井207。波导组件可以包括用于保持样本的其它结构。

[0111] 在替选布置中,波导结构的端面限定用于保持样本206的停靠件207。即,波导结构的端面限定样本井207。在本示例中,激发波导组件1的端面的、沿着波导组件1导向的输入光被导向到样本206上。可以通过下至或穿过基板层而终止波导结构来限定样本井207。通常,可以通过刻蚀或打通波导结构来终止该波导结构。

[0112] 图7示出端面照射布置的示例。波导组件1包括形成在基板201上的多核心波导结构以及由波导结构的端面250限定的样本井207。波导结构的端面250限定样本井207的壁以及提供可支撑样本206的支撑件。

[0113] 多核心波导结构的层包括第一光学导向层203a和第二光学导向层203b(或第一核心层203a和第二核心层203b)。第一核心层203a被夹在上包覆层204与下包覆层202之间。下包覆层204布置在基板201与第一核心层203a之间。第二核心层203b被夹在上包覆层204与顶部包覆层214之间。第一核心层203a具有比上包覆层204和下包覆层202更高的折射率。第二核心层203b具有比上包覆层204和顶部包覆层214更高的折射率。

[0114] 样本井和端面由在多核心波导结构中蚀刻的、下至基板层201的间隙形成,从而可以将输入光导出波导结构并从各个核心导入自由空间或样本中。

[0115] 在超分辨率成像期间的第一时间,致动器12将光注入设备40放在第一光注入位置

上。在第一光注入位置上,光注入设备将输入光注入波导组件1中以引导该输入光穿过多核心波导结构的第一核心203a。第一核心层203a将注入光在第一高度上导出波导结构并穿过样本井207的第一区域。

[0116] 在超分辨率成像期间的第二时间(在第一时间之后),致动器12将光注入设备40放在第二光注入位置上。在第二光注入位置上,光注入设备将输入光注入波导组件1中以引导该输入光穿过多核心波导结构的第二核心203b。第二核心层203b将注入光在第二高度上导出波导结构并穿过样本井207的第二区域。该第二高度由第二核心层203b相对于第一核心区域203a的位置限定。通过分离区域将穿过样本井207的第一区域510与第二区域520分离,激发光不被导向到该分离区域中。

[0117] 导出波导结构的光刺激样本中的荧光团以发荧光且发射光。在样本的第一区域510中基本上仅荧光团被从第一核心层203a发出的激发光刺激。类似地,在样本的第二区域520中仅荧光团被从第二核心层203b发出的激发光刺激。在样本206中激发的量基本上受限于从波导结构的边缘面250发出的激发光的量。

[0118] 收集且处理发射光以提供超分辨率成像,如参照图2所描述。通过导向激发光穿过样本井的不同区域,多核心结构有利地使得能够利用激发光刺激样本206在样本井207中的不同区域。特别地,多核心波导允许位于样本内的不同高度的荧光团被刺激且以该方式从样本的不同深度发射光。收集从样本的不同深度发射的光实现在不同样本深度下的超分辨率成像。(将理解,本文中对高度、深度、宽度等的引用不应当被理解为限制该装置按特定方位操作,除非上下文要求如此)。

[0119] 总之,在本示例中,端面250自身为样本井207的侧壁的一部分且被样本206接触。例如,使用合适的耦合技术,例如利用将待耦合的光聚焦在与端面250相对的进入面上的物镜,从图6的左侧将光耦合到各自的波导层。

[0120] 在导向到样本206上的激发光从波导结构的端面25发出的布置中,波导结构的上包覆层204可以为空气。即,波导结构的层可以包括布置在基板201上的下包覆区域202以及布置在下包覆区域202上的核心区域203。

[0121] 尽管在图7中未示出,但是可以将样本井中的样本206放置成脱离与波导结构的端面250的接触、而不是与端面250接触。在该布置中,激发光在从端面250到样本206的自由空间中传播。

[0122] 可选地,在该布置中的样本井207可以包括沉积在基板201的顶部上的井的底部的生物层205。该生物层205防止样本中的荧光团非特异结合到基板层201且可以包括BSA、PEG或PLL。此外,生物层促进直接在样本井207内培养样本。生物层205是优选的但不是强制的。

[0123] 可选地,波导结构的边缘面250为平坦的。

[0124] 从波导结构的边缘面250发出的激发光可以略微发散。激发光的发散度取决于波导结构在边缘面250处的宽度。为了减小从波导结构的端面导出的激发光的发散度,可以使波导结构的宽度沿着其长度渐缩,以形成用于聚焦激发光的透镜。

[0125] 图8a示出条状波导结构400,该条状波导结构400的宽度沿着其长度渐缩以形成锥形端面650。可选地,也可以使波导的高度沿着其长度渐缩,以限定在两个维度上渐缩的端面。发明人已发现,使波导区域的端面650渐缩以在至少一个维度上限定轴棱锥透镜特别有利于减小从波导结构导出到样本206上的光(即激发光)的发散度。将波导结构的端面形成

为锥形尖端650创建用于光束成形的轴棱锥透镜。该轴棱锥透镜提供沿着输入光穿过波导结构的传播方向的线聚焦。

[0126] 可以使用离子束研磨或任何其它合适的蚀刻技术使波导结构的宽度渐缩,以根据合适掩模使波导的端面成形以形成透镜。可替代地,可以使用再生长和选择性生长或任何其它合适的外延技术使波导结构的宽度渐缩,以波导的端面成形以形成透镜。也可以使用合适的刻蚀工艺使波导结构的高度渐缩(例如渐缩为一点)。

[0127] 附加地或可替代地,可以提供光栅660以将光聚焦在波导结构的端面处,以减小从波导结构的端面导出的激发光的发散度。

[0128] 图8b示出布置在条状波导结构的端面的光栅660。在本示例中,光栅660重叠激发光并使激发光向内发射,从而减小激发光的发散度且将激发光聚焦到样本206上。可以使用标准蚀刻技术将光栅660蚀刻为波导结构和/或基板的一层或多层。

[0129] 波导结构的端部区域可以限定静态或可编程声光栅660,从而使从波导结构发出的激发光在垂直于基板层201且平行于物镜4的光轴3的平面上偏转。因此,可以通过调整可编程声光栅660来控制从波导结构发出的激发光的光束的高度。

[0130] 本领域的技术人员将理解,已通过描述本发明的多个具体实施方式来说明本发明,但是本发明不限于这些实施方式。在所附权利要求的范围内,许多变型和修改是可能的。

[0131] 本文中包含的对现有技术的任何引用不构成承认这类技术在世界的任何国家中形成公知常识的一部分。词语“包括”及其变型(诸如“具有”和“包含”)以包容性或开放性来使用(即,从而不排除其它特征的存在或添加),除了上下文由于明确语言或必要暗示而另有要求的情况。

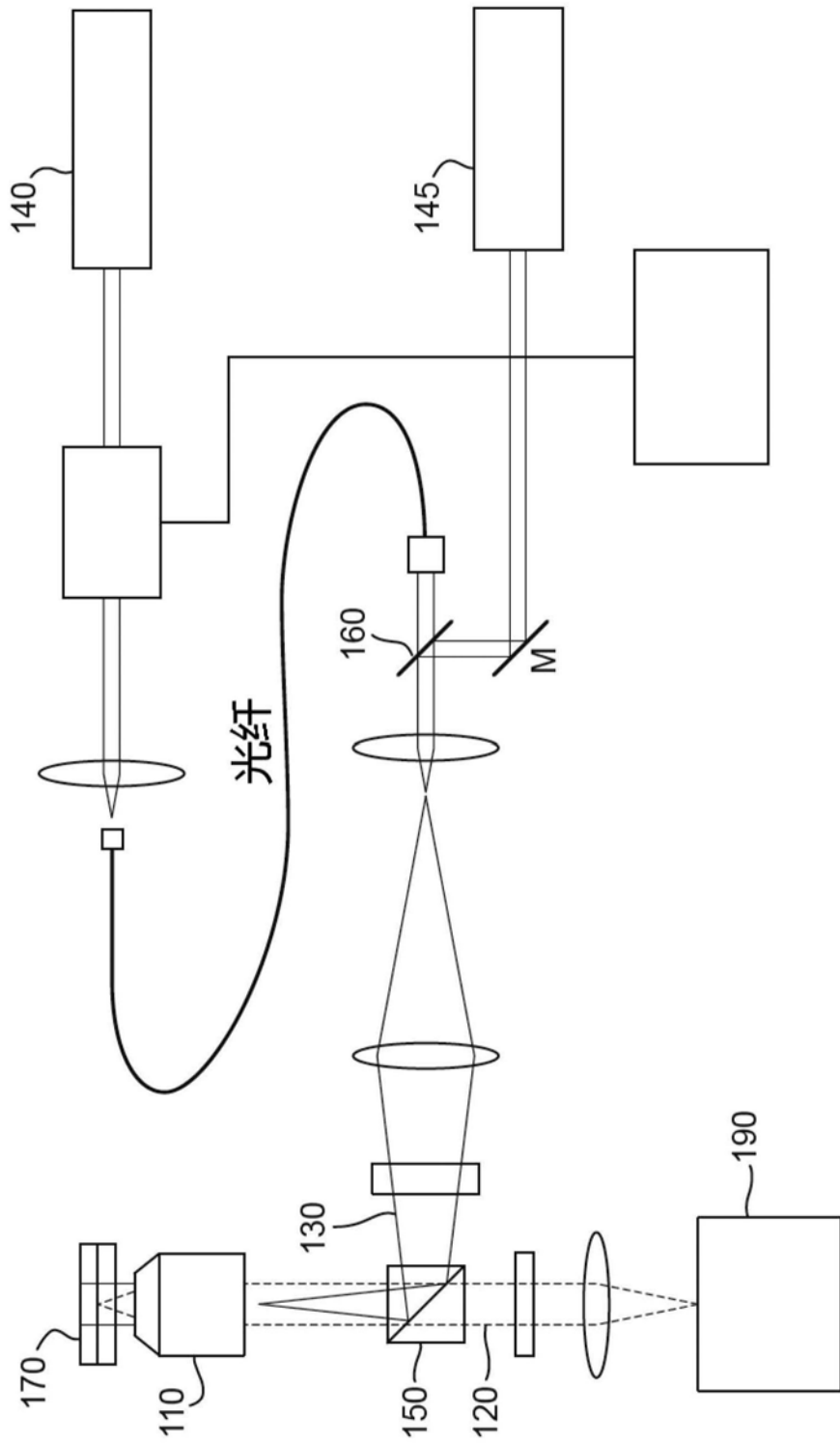


图1 (现有技术)

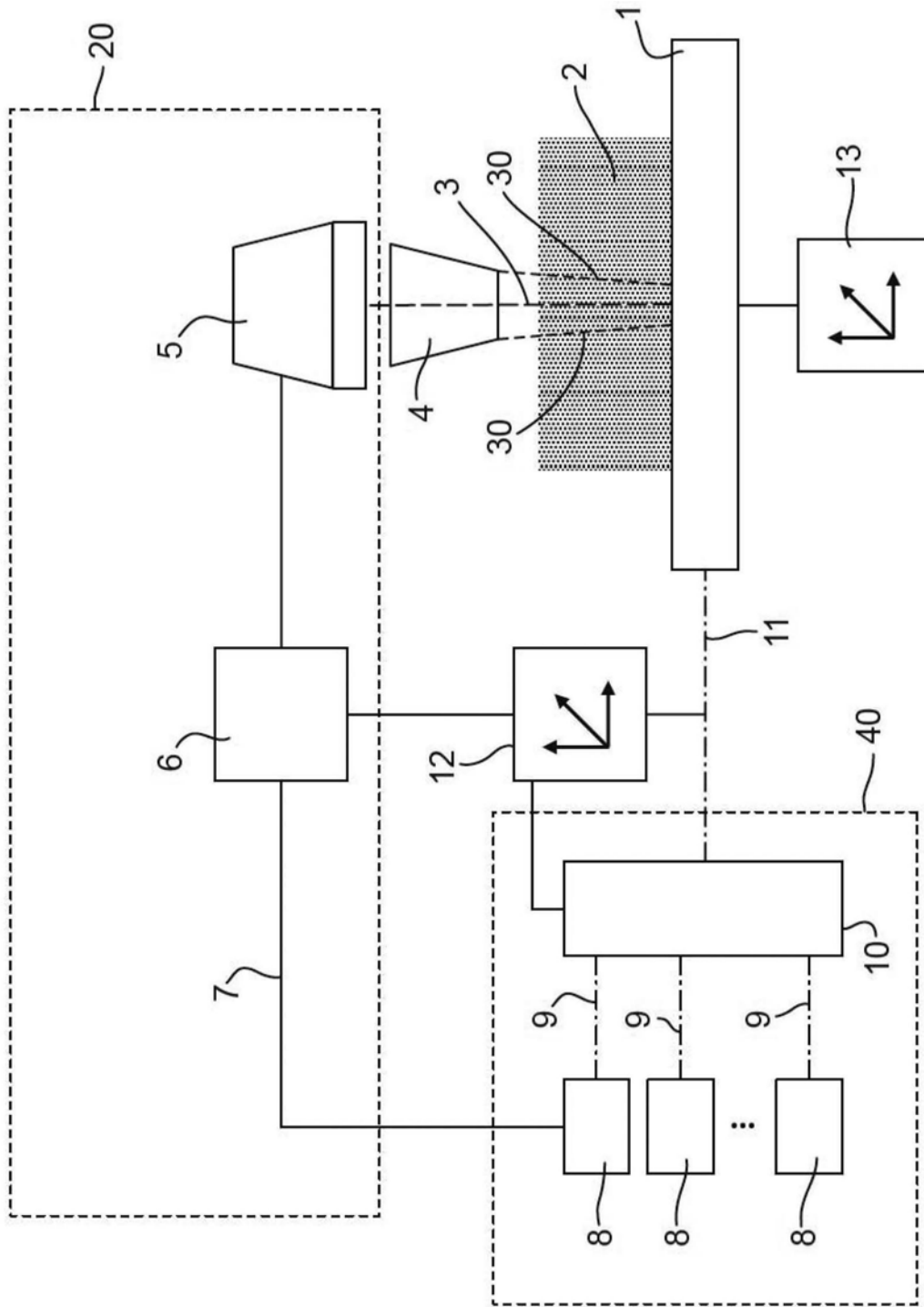


图2

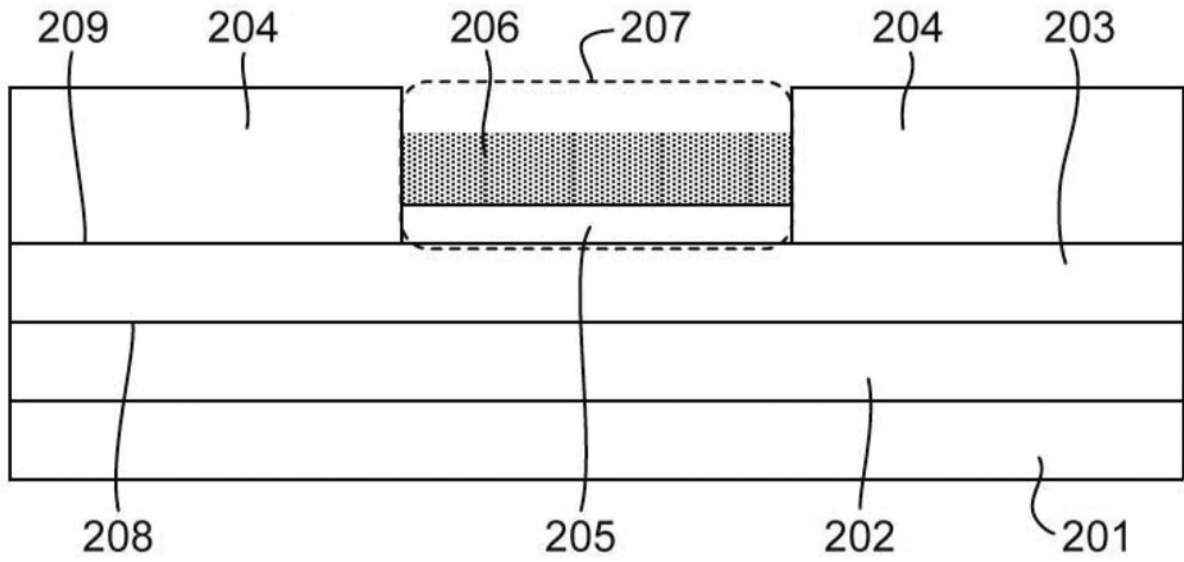


图3

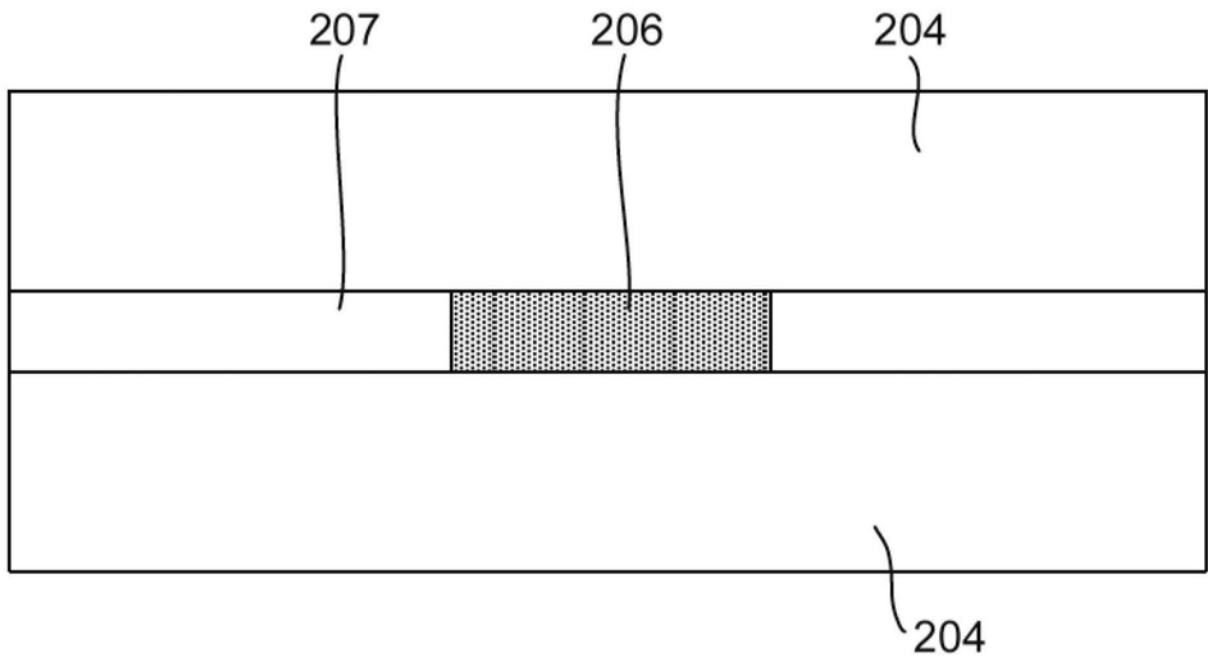


图4

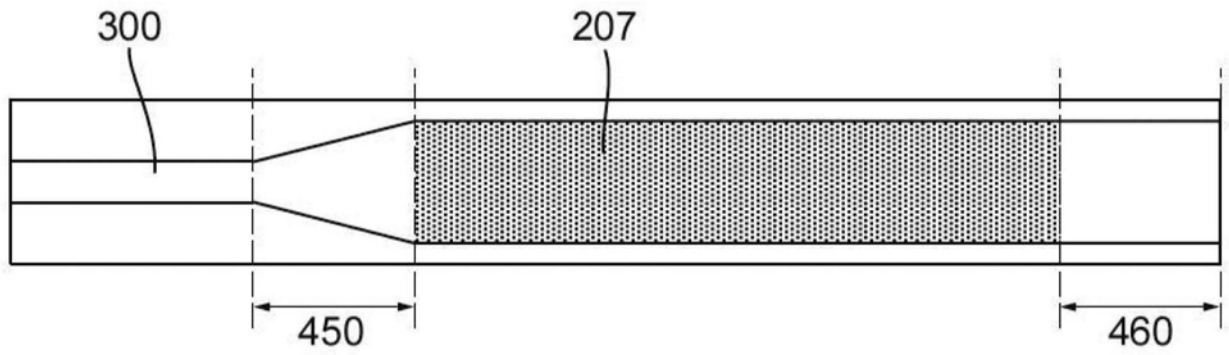


图5a

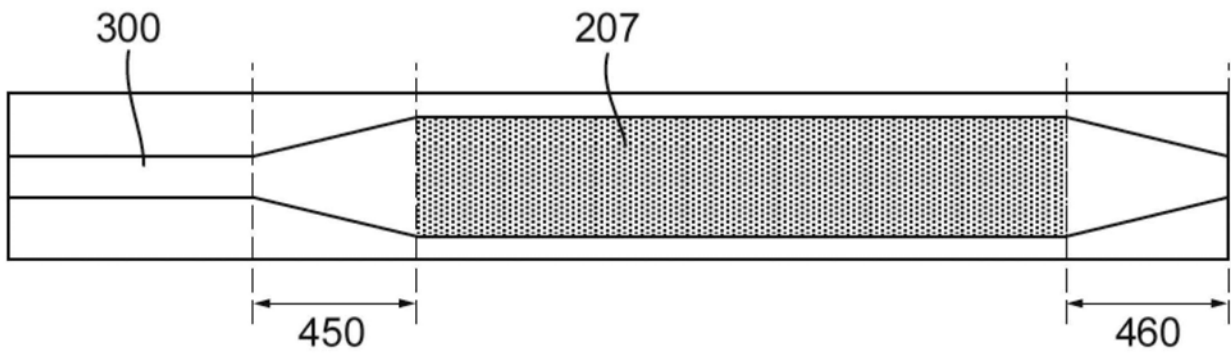


图5b

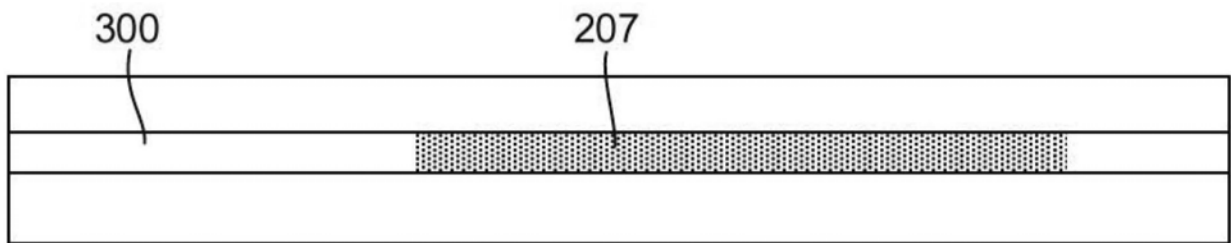


图5c

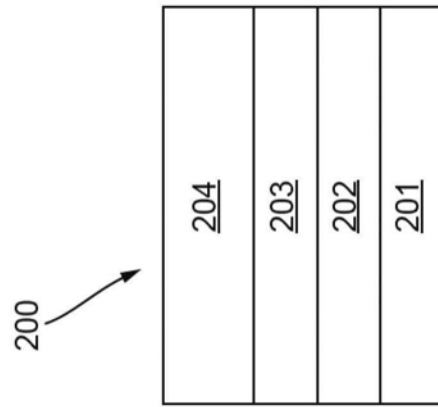


图6a

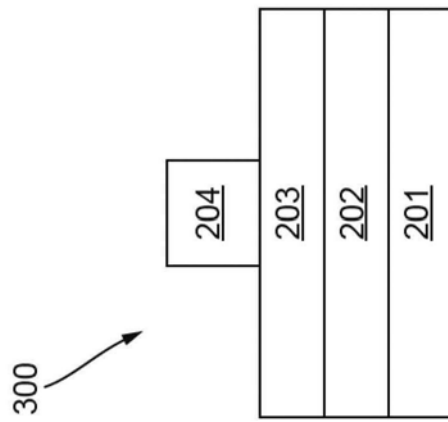


图6b

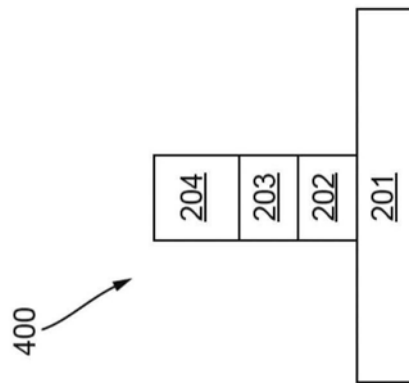


图6c

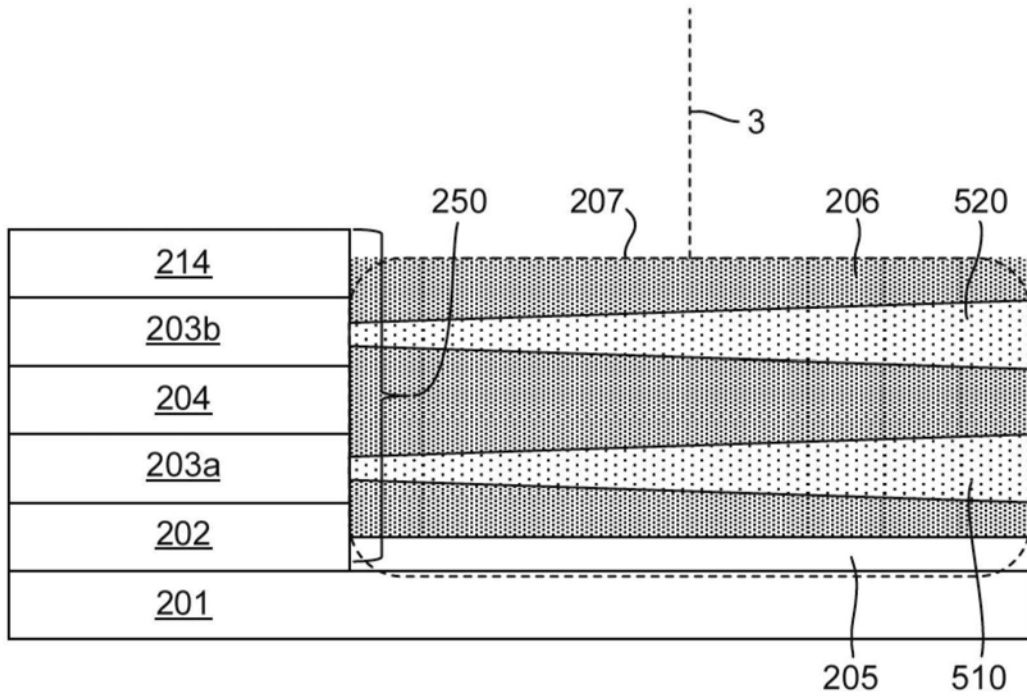


图7

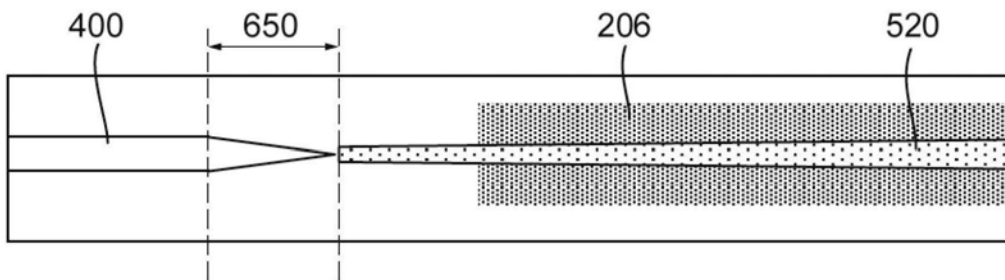


图8a

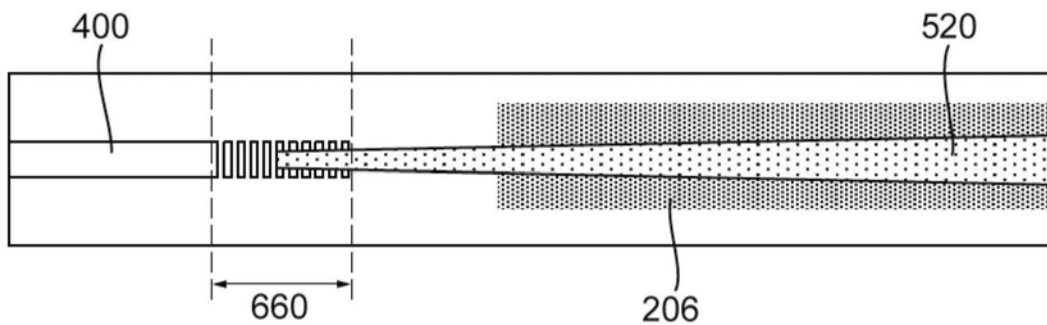


图8b