



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112798564 B

(45) 授权公告日 2022.10.11

(21) 申请号 202011524528.0

G01N 21/01 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.22

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102735617 A, 2012.10.17

申请公布号 CN 112798564 A

US 2015015879 A1, 2015.01.15

(43) 申请公布日 2021.05.14

CN 214374304 U, 2020.12.22

(73) 专利权人 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

CN 105784653 A, 2016.07.20

US 2017307440 A1, 2017.10.26

地址 215163 江苏省苏州市高新区科技城科灵路88号

CN 206627440 U, 2017.11.10

Virginie Hame et.al. Correlative multicolor 3D SIM and STORM microscopy. 《BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS》. 2014, 第5卷(第10期), 3326-3336.

(72) 发明人 李思颀 陈晓虎 文刚 梁永金鑫 李辉

Yong Liang et.al. High Dynamic Range Structured Illumination Microscope Based on Multiple Exposures. 《Frontiers in Physics》. 2021, 第9卷7 pages.

(74) 专利代理机构 南京理工大学专利中心 32203

专利代理师 朱炳斐 马鲁晋

审查员 朱筠清

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

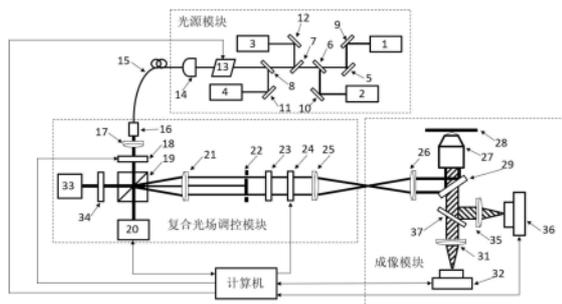
权利要求书3页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统

(57) 摘要

本发明公开了一种随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,包括:光源模块,用于提供多个不同波长的合束照明光线,并控制光线照明时序,还用于控制单一波长光线照明,或者多个波长光线交替照明,或者多个波长光线同时照明;复合光场调控模块,包括用于将入射光场调控为余弦结构照明光场的第一光学调控装置,和用于将入射光场调控为均匀照明光场的第二光学调控装置;两种光学调控装置可以独立工作、交替工作或者同时工作;荧光成像模块,用于采集样本的多幅原始荧光图像并由计算机重建超分辨图像。本发明通过在一套光学成像平台实现随机光学重建与结构光照明两种超分辨成像技术联用,可实现对复杂生物体系的多模式、跨分辨率尺度同时成像。



CN 112798564 B

1. 一种随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,其特征在于,所述系统包括:
光源模块,用于提供多个不同波长的合束照明光线,并控制光线照明时序,还用于控制单一波长光线照明,或者多个波长光线交替照明,或者多个波长光线同时照明;

复合光场调控模块,包括用于将入射光场调控为余弦结构照明光场的第一光学调控装置,和用于将入射光场调控为均匀照明光场的第二光学调控装置;两种光学调控装置可以独立工作、交替工作或者同时工作;

荧光成像模块,用于采集样本的多幅原始荧光图像并由计算机重建超分辨图像;

所述光源模块包括:多个波长不同的光源、反射合束组件、声光可调谐滤波器(13)、光纤耦合器(14)、保偏光纤(15);所述多个波长不同的光源发出的光线通过反射合束组件合束后,照射到声光可调谐滤波器(13),所述声光可调谐滤波器(13)的一级衍射光经光纤耦合器(14)收集进入保偏光纤(15)中,之后经保偏光纤(15)将光线引入复合光场调控模块;

所述反射合束组件包括:

多个反射镜,分别对应不同波长的光源,并将所有光源发出的光线引导至二向色镜上完成合束;

多个二向色镜,用于将来自反射镜的光线合束为一个光束,并将该光束传输给声光可调谐滤波器(13);

或,其中某个或多个光源发出的光线直接与某个二向色镜匹配,省略与之对应的反射镜;

所述多个波长不同的光源包括第一光源(1)、第二光源(2)、第三光源(3)、第四光源(4);所述反射合束组件包括第一反射镜(5)、第二反射镜(9)、第三反射镜(10)、第四反射镜(11)、第五反射镜(12)、第一二向色镜(6)、第二二向色镜(7)、第三二向色镜(8);

所述第一光源(1)发出的光线依次通过第二反射镜(9)、第一反射镜(5)后,依次透过第一二向色镜(6)、第二二向色镜(7)、第三二向色镜(8);

所述第二光源(2)发出的光线通过第三反射镜(10)后,经第一二向色镜(6)反射,再依次透过第二二向色镜(7)、第三二向色镜(8);

所述第三光源(3)发出的光线通过第五反射镜(12)后,经第二二向色镜(7)反射,再透过第三二向色镜(8);

所述第四光源(4)发出的光线通过第四反射镜(11)后,经第三二向色镜(8)反射,与来自其他三个激光器的光线合束后一起传输给声光可调谐滤波器(13);

所述复合光场调控模块包括:

光纤准直扩束组件,包括沿光源模块出射光线所在光轴依次设置的光纤准直器(16)、激光扩束器(17)、第一消色差二分之一波片(18);

第一光学调控装置,包括空间光调制器(20)、偏振分光棱镜(19)、傅里叶透镜(21)、多孔掩模板(22)、偏振旋转器(23)、液晶位相补偿器(24)、准直透镜(25);

第二光学调控装置,包括二维扫描振镜(33)、第二消色差二分之一波片(34)、偏振分光棱镜(19)、傅里叶透镜(21)、多孔掩模板(22)、偏振旋转器(23)、液晶位相补偿器(24)、准直透镜(25);

4f成像系统,包括傅里叶透镜(21)和准直透镜(25),即傅里叶透镜(21)的后焦面与准直透镜(25)的前焦面重合;

所述空间光调制器(20)和二维扫描振镜(33)均位于所述4f成像系统的前焦面;所述多孔掩模板(22)处于4f成像系统的傅里叶面;

所述4f成像系统与荧光成像模块光学连接;

所述复合光场调控模块实现结构光照明模式的过程:光纤准直扩束组件输出的光经偏振分光棱镜(19)透射入射至空间光调制器(20),之后经空间光调制器(20)反射、偏振分光棱镜(19)反射后依次通过傅里叶透镜(21)、多孔掩模板(22)、偏振旋转器(23)、液晶位相补偿器(24)、准直透镜(25);

所述复合光场调控模块实现均匀照明模式的过程:光纤准直扩束组件输出的光经偏振分光棱镜(19)反射后依次通过第二消色差二分之一波片(34)、二维扫描振镜(33),经二维扫描振镜(33)反射后依次通过第二消色差二分之一波片(34)、偏振分光棱镜(19),再经偏振分光棱镜(19)透射后依次通过傅里叶透镜(21)、多孔掩模板(22)、偏振旋转器(23)、液晶位相补偿器(24)、准直透镜(25);

所述空间光调制器(20)上加载了二元周期性条纹计算全息图,光线经空间光调制器(20)衍射到多个级次;

所述多孔掩模板(22)由 $2N$ 个旋转对称分布的针孔构成,每个针孔为长方形结构,长边中心位置对应样品面全内反射临界角,其中 N 为整数;该多孔掩模板(22)用于实现空间滤波,仅允许满足特定入射角度的光线进入荧光成像模块照明样品,且从针孔不同位置通过的光线具有不同的入射角度;

所述偏振旋转器(23)用于使从任意一个针孔通过的光束的偏振态都垂直于该针孔中心点与4f成像系统光轴所确定的平面;

所述液晶位相补偿器(24)的快轴方向与偏振分光棱镜(19)的透射光偏振方向平行,液晶位相补偿器(24)用于主动补偿光学元件引起的激光位相漂移,使得最终到达样品面的任意一束光线的偏振态都保持为线偏振态,且偏振方向垂直该光线的入射面;

所述荧光成像模块包括两个相机,一个相机接收结构照明光场激发的荧光并成像,另一个相机接收均匀照明光场激发的荧光并成像,相机采集的原始图像经计算机重建超分辨率图像,且两个相机的图像采集时序与复合光场调控模块和光源模块通过计算机同步控制;

所述荧光成像模块包括:

实现结构光照明超分辨率成像的装置,包括透镜(26)、显微物镜(27)、样品台(28)、第四二向色镜(29)、第五二向色镜(37)、第一管透镜(31)、第一相机(32);复合光场调控模块的出射光透过透镜(26)后再经第四二向色镜(29)反射后照射放置于样品台(28)上的样品表面,产生余弦结构照明光场,激发样品发射荧光,激发的荧光经显微物镜(27)收集,之后依次经第四二向色镜(29)透射、第五二向色镜(37)透射、第一管透镜(31)后成像到第一相机(32)的探测面;

实现均匀光照明超分辨率成像的装置,包括透镜(26)、显微物镜(27)、样品台(28)、第四二向色镜(29)、第五二向色镜(37)、第二管透镜(35)、第二相机(36);复合光场调控模块的出射光透过透镜(26)后再经第四二向色镜(29)反射后照射放置于样品台(28)上的样品表面,产生均匀照明光场,激发样品发射荧光,激发的荧光经显微物镜(27)收集,之后依次经第四二向色镜(29)透射、第五二向色镜(37)反射、第二管透镜(35)后成像到第二相机(36)的探测面。

2. 根据权利要求1所述的随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,其特征在于,所述第一消色差二分之一波片(18)安装在电动旋转波片架上,其快轴方向与偏振分光棱镜(19)透射光偏振方向夹角为 θ ,经偏振分光棱镜(19)透射照明液晶空间光调制器(20)的光强与 $\sin^2(2\theta)$ 成正比,经偏振分光棱镜(19)反射照明二维扫描振镜(33)的光强与 $\cos^2(2\theta)$ 成正比。

3. 根据权利要求2所述的随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,其特征在于,当 $\sin^2(2\theta) = 1, \cos^2(2\theta) = 0$ 时,复合光场调控模块独立工作在结构光照明模式;当 $\sin^2(2\theta) = 0, \cos^2(2\theta) = 1$ 时,复合光场调控模块独立工作在均匀照明模式;当 θ 等于其它值时,两种成像模式同时工作;通过控制夹角 θ 的取值,可使复合光场调控模块在结构光照明模式和均匀照明模式之间相互切换,也可以使两种成像模式同时工作。

随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统

技术领域

[0001] 本发明属于显微成像技术领域,特别是一种随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统。

背景技术

[0002] 荧光超分辨成像具有广泛的应用前景,目前已经存在多种超分辨成像技术,包括随机光学重建超分辨成像技术、结构光照明超分辨成像技术、受激辐射损耗超分辨成像技术等。这些技术在提高分辨率的同时,伴随着成像速度降低、照明光功率升高、光毒性增大、成像视场变小等不利因素。

[0003] 现有技术中,随机光学重建超分辨成像方法 (STORM) 的技术原理是:利用光开关荧光蛋白,将衍射极限范围内的单个分子在不同的时间随机地激活,并将各个荧光分子精确定位再重组,叠加获得超分辨图像,分辨率能够达到10nm甚至更高。随机光学重建显微镜主要用于细胞内单分子成像以及观测精细亚细胞结构,如观测细胞内单个蛋白的精确定位,观测蛋白与蛋白之间的相互作用,以及细胞内的微丝,微管,粘着斑,内含物等精细结构。但是随机光学重建显微镜需要采集大量原始图像(典型值为2万幅)才能重构出一张超分辨图像,成像时间从数秒钟到数十分钟不等,时间分辨率较低,难以用于活细胞成像。

[0004] 结构光照明超分辨成像方法 (SIM) 的技术原理是:将多重相互干涉的光束照射到样本上,然后从收集到的荧光图像中提取高分辨率的信息,并重构超分辨图像。结构光照明超分辨技术因其成像速度快,激发光能量较低,对细胞伤害小,主要被用于观测亚细胞水平的活体观测,包括线粒体动态变化,细胞骨架动态变化,染色体动态变化,细胞内小囊泡运动,病毒在细胞内的移动等。但结构光照明的成像分辨率最高能较传统荧光显微镜提高2倍,达到100nm水平,难以诸如马达蛋白沿细胞骨架运动、病原体颗粒入侵细胞过程等精细生化反应,这限制了其在超微生物学、医学等领域中的应用。

[0005] 生命科学和基础医学等领域对高端成像技术的需求,涵盖了超高空间分辨率、成像速度快、光照功力低、光毒性小、成像视场大等,这些需求从技术层面看存在难以调和的矛盾,目前尚没有任何单一技术手段能够同时满足这些需求,将不同类型的技术联用是突破相关困境的重要突破方向。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,满足生命科学和基础医学研究中跨分辨率尺度成像的迫切需求。

[0007] 实现本发明目的的技术解决方案为:一种随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,所述系统包括:

[0008] 光源模块,用于提供多个不同波长的合束照明光线,并控制光线照明时序,还用于控制单一波长光线照明,或者多个波长光线交替照明,或者多个波长光线同时照明;

[0009] 复合光场调控模块,包括用于将入射光场调控为余弦结构照明光场的第一光学调

控装置,和用于将入射光场调控为均匀照明光场的第二光学调控装置;两种光学调控装置可以独立工作、交替工作或者同时工作;

[0010] 荧光成像模块,用于采集样本的多幅原始荧光图像并由计算机重建超分辨图像。

[0011] 进一步地,所述光源模块包括:多个波长不同的光源、反射合束组件、声光可调谐滤波器、光纤耦合器、保偏光纤;所述多个波长不同的光源发出的光线通过反射合束组件合束后,照射到声光可调谐滤波器,所述声光可调谐滤波器的一级衍射光经光纤耦合器收集进入保偏光纤中,之后经保偏光纤将光线引入复合光场调控模块。

[0012] 进一步地,所述反射合束组件包括:

[0013] 多个反射镜,分别对应不同波长的光源,并将所有光源发出的光线引导至二向色镜上完成合束;

[0014] 多个二向色镜,用于将来自反射镜的光线合束为一个光束,并将该光束传输给声光可调谐滤波器;

[0015] 或,其中某个或多个光源发出的光线直接与某个二向色镜匹配,省略与之对应的反射镜。

[0016] 进一步地,所述多个波长不同的光源包括第一光源、第二光源、第三光源、第四光源;所述反射合束组件包括第一反射镜、第二反射镜、第三反射镜、第四反射镜、第五反射镜、第一二向色镜、第二二向色镜、第三二向色镜;

[0017] 所述第一光源发出的光线依次通过第二反射镜、第一反射镜后,依次透过第一二向色镜、第二二向色镜、第三二向色镜;

[0018] 所述第二光源发出的光线通过第三反射镜后,经第一二向色镜反射,再依次透过第二二向色镜、第三二向色镜;

[0019] 所述第三光源发出的光线通过第五反射镜后,经第二二向色镜反射,再透过第三二向色镜;

[0020] 所述第四光源发出的光线通过第四反射镜后,经第三二向色镜反射,与来自其他三个激光器的光线合束后一起传输给声光可调谐滤波器。

[0021] 进一步地,所述复合光场调控模块包括:

[0022] 光纤准直扩束组件,包括沿光源模块出射光线所在光轴依次设置的光纤准直器、激光扩束器、第一消色差二分之一波片;

[0023] 第一光学调控装置,包括空间光调制器、偏振分光棱镜、傅里叶透镜、多孔掩模板、偏振旋转器、液晶位相补偿器、准直透镜;

[0024] 第二光学调控装置,包括二维扫描振镜、第二消色差二分之一波片、偏振分光棱镜、傅里叶透镜、多孔掩模板、偏振旋转器、液晶位相补偿器、准直透镜;

[0025] 4f成像系统,包括傅里叶透镜和准直透镜,即傅里叶透镜的后焦面与准直透镜的前焦面重合;

[0026] 所述空间光调制器和二维扫描振镜均位于所述4f成像系统的前焦面;所述多孔掩模板处于4f成像系统的傅里叶面;

[0027] 所述4f成像系统与荧光成像模块光学连接;

[0028] 所述复合光场调控模块实现结构光照明模式的过程:光纤准直扩束组件输出的光经偏振分光棱镜透射入射至空间光调制器,之后经空间光调制器反射、偏振分光棱镜反射

后依次通过傅里叶透镜、多孔掩模板、偏振旋转器、液晶位相补偿器、准直透镜；

[0029] 所述复合光场调控模块实现均匀照明模式的过程：光纤准直扩束组件输出的光经偏振分光棱镜反射后依次通过第二消色差二分之一波片、二维扫描振镜，经二维扫描振镜反射后依次通过第二消色差二分之一波片、偏振分光棱镜，再经偏振分光棱镜透射后依次通过傅里叶透镜、多孔掩模板、偏振旋转器、液晶位相补偿器、准直透镜。

[0030] 进一步地，所述空间光调制器上加载了二元周期性条纹计算全息图，光线经空间光调制器衍射到多个级次；

[0031] 所述多孔掩模板由 $2N$ 个旋转对称分布的针孔构成，每个针孔为长方形结构，长边中心位置对应样品面全内反射临界角，其中 N 为整数；该多孔掩模板用于实现空间滤波，仅允许满足特定入射角度的光线进入荧光成像模块照明样品，且从针孔不同位置通过的光线具有不同的入射角度；

[0032] 所述偏振旋转器用于使从任意一个针孔通过的光束的偏振态都垂直于该针孔中心点与 $4f$ 成像系统光轴所确定的平面；

[0033] 所述位相补偿器的快轴方向与偏振分光棱镜的透射光偏振方向平行，位相补偿器用于主动补偿光学元件引起的激光位相漂移，使得最终到达样品面的任意一束光线的偏振态都保持为线偏振态，且偏振方向垂直该光线的入射面。

[0034] 进一步地，所述第一消色差二分之一波片安装在电动旋转波片架上，其快轴方向与偏振分光棱镜透射光偏振方向夹角为 θ ，经偏振分光棱镜透射照明液晶空间光调制器的光强与 $\sin^2(2\theta)$ 成正比，经偏振分光棱镜反射照明二维扫描振镜的光强与 $\cos^2(2\theta)$ 成正比。

[0035] 进一步地，当 $\sin^2(2\theta) = 1, \cos^2(2\theta) = 0$ 时，复合光场调控模块独立工作在结构光照明模式；当 $\sin^2(2\theta) = 0, \cos^2(2\theta) = 1$ 时，复合光场调控模块独立工作在均匀照明模式；当 θ 等于其它值时，两种成像模式同时工作；通过控制夹角 θ 的取值，可使复合光场调控模块在结构光照明模式和均匀照明模式之间相互切换，也可以使两种成像模式同时工作。

[0036] 进一步地，所述荧光成像模块包括两个相机，一个相机接收结构照明光场激发的荧光并成像，另一个相机接收均匀照明光场激发的荧光并成像，相机采集的原始图像经计算机重建超分辨图像，且两个相机的图像采集时序与复合光场调控模块和光源模块通过计算机同步控制。

[0037] 进一步地，所述荧光成像模块包括：

[0038] 实现结构光照明超分辨成像的装置，包括透镜、显微物镜、样品台、第四二向色镜、第五二向色镜、第一管透镜、第一相机；复合光场调控模块的出射光透过透镜后再经第四二向色镜反射后照射放置于样品台上的样品表面，产生余弦结构照明光场，激发样品发射荧光，激发的荧光经显微物镜收集，之后依次经第四二向色镜透射、第五二向色镜透射、第一管透镜后成像到第一相机的探测面；

[0039] 实现均匀光照明超分辨成像的装置，包括透镜、显微物镜、样品台、第四二向色镜、第五二向色镜、第二管透镜、第二相机；复合光场调控模块的出射光透过透镜后再经第四二向色镜反射后照射放置于样品台上的样品表面，产生均匀照明光场，激发样品发射荧光，激发的荧光经显微物镜收集，之后依次经第四二向色镜透射、第五二向色镜反射、第二管透镜后成像到第二相机的探测面。

[0040] 针对细胞生物学、临床病理诊断等领域的成像需求，本发明提出一种随机光学重

建与结构光照明复合超分辨成像方法与系统,实质是将两种技术的优点融合在一起,其相对于传统的显微检测系统具有如下优点:

[0041] 1) 联用STORM和SIM技术可以实现跨分辨率尺度同时成像观测,例如在对活细胞马达蛋白沿细胞骨架运动研究中,可实现对马达蛋白进行纳米级分辨率STORM成像,同时对细胞骨架进行百纳米级分辨率SIM成像。所述跨分辨率尺度同时成像能力在细胞物质转运、病原体感染过程等领域具有广泛需求,且现有技术无法满足。

[0042] 2) 在以SIM成像为目标的研究中,可对感兴趣的重点区域开展原位STROM超高分辨率成像,克服了SIM成像速度快、成像视场大但分辨率较低的问题,同时避免了二次成像带来的定位不准和样品状态变化等问题。

[0043] 3) 在以STORM成像为目标的研究中,通过快速SIM成像引导STORM成像和分析,可以显著降低STROM原始数据量,提高成像速度。

[0044] 4) 在一套成像平台上同时实现STORM和SIM成像,可以共用大部分硬件设备,显著降低获得相同成像功能的经济成本,减少仪器占用的生物实验室空间资源。

[0045] 下面结合附图对本发明作进一步详细描述。

附图说明

[0046] 图1为一个实施例中随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统结构示意图。

[0047] 图2(a)为多孔掩模板结构图,(b)为在均匀照明模式下,显微物镜后瞳面测量的入射光斑分布;(c)-(e)为在结构光照明模式下,显微物镜后瞳面测量的入射光斑分布。

[0048] 图3为一个实施例中本发明拍摄的超分辨图像,其中(a)为乳腺癌细胞HER2阳性信号SIM成像,(b)为乳腺癌细胞骨架STORM成像。

[0049] 图中各标记如下:1激光器647nm;2激光器561nm;3激光器488nm;4激光器405nm;反射镜9,5,10,11,12;二向色镜6,7,8,29;13声光可调谐滤波器;14光纤耦合器;15保偏光纤;16光纤准直器;17激光扩束器;18消色差二分之一波片;19偏振分光棱镜;20空间光调制器;21傅里叶透镜;22多孔掩模板;23偏振旋转器;24液晶位相补偿器;25准直透镜;26透镜;27显微物镜;28样品台;30荧光滤色片;31管透镜;32相机;33二维扫描振镜;34消色差二分之一波片;35管透镜;36相机;37荧光滤色片。

具体实施方式

[0050] 为了使本申请的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本申请进行进一步详细说明。应当理解,此处描述的具体实施例仅仅用以解释本申请,并不用于限定本申请。

[0051] 另外,若本发明实施例中有涉及“第一”、“第二”等的描述,则该“第一”、“第二”等的描述仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示其相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。另外,各个实施例之间的技术方案可以相互结合,但是必须是以本领域普通技术人员能够实现为基础,当技术方案的结合出现相互矛盾或无法实现时应当认为这种技术方案的结合不存在,也不在本发明要求的保护范围之内。

[0052] 在一个实施例中,本发明提供了一种随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,所述系统包括:

[0053] 光源模块,用于提供多个不同波长的合束照明光线,并控制光线照明时序,还用于控制单一波长光线照明,或者多个波长光线交替照明,或者多个波长光线同时照明;

[0054] 复合光场调控模块,包括用于将入射光场调控为余弦结构照明光场的第一光学调控装置,和用于将入射光场调控为均匀照明光场的第二光学调控装置;两种光学调控装置可以独立工作、交替工作或者同时工作;

[0055] 荧光成像模块,用于采集样本的多幅原始荧光图像并由计算机重建超分辨图像。

[0056] 本发明通过将随机光学重建超分辨成像技术与结构光照明超分辨成像技术联用,实现复合超分辨成像,即可以独立开展SIM或者STOM成像;也可以首先通过SIM快速成像,定位感兴趣的重点区域,再对重点区域进行STORM超高分辨率成像;还可以对样品同时进行SIM和STOM成像。兼具高空间分辨率、高成像速度、大成像视场和低光毒性等优点,能够同时满足多种模式成像需求,特别是可以实现对同一生物样本原位地跨分辨率尺度的同时成像。此外本复合成像系统可同时在一套成像平台上实现SIM和STORM两种超分辨成像技术联用,二者共用大部分的硬件设备,能够降低获得相同成像功能的经济成本,减小设备占用的实验室空间资源,简化系统维护的复杂程度。

[0057] 进一步地,在其中一个实施例中,所述光源模块包括:多个波长不同的光源、反射合束组件、声光可调谐滤波器13、光纤耦合器14、保偏光纤15;所述多个波长不同的光源发出的光线通过反射合束组件合束后,照射到声光可调谐滤波器13,所述声光可调谐滤波器13的一级衍射光经光纤耦合器14收集进入保偏光纤15中,之后经保偏光纤15将光线引入复合光场调控模块。

[0058] 所述控制光线照明时序,还用于控制单一波长光线照明,或者多个波长光线交替照明,或者多个波长光线同时照明,均通过控制声光可调谐滤波器13实现。

[0059] 进一步地,在其中一个实施例中,所述反射合束组件包括:

[0060] 多个反射镜,分别对应不同波长的光源,并将所有光源发出的光线引导至二向色镜上完成合束;

[0061] 多个二向色镜,用于将来自反射镜的光线合束为一个光束,并将该光束传输给声光可调谐滤波器13;

[0062] 或,其中某个或多个光源发出的光线直接与某个二向色镜匹配,省略与之对应的反射镜。

[0063] 进一步地,在其中一个实施例中,所述多个波长不同的光源包括第一光源1、第二光源2、第三光源3、第四光源4;所述反射合束组件包括第一反射镜5、第二反射镜9、第三反射镜10、第四反射镜11、第五反射镜12、第一二向色镜6、第二二向色镜7、第三二向色镜8;

[0064] 所述第一光源1发出的光线依次通过第二反射镜9、第一反射镜5后,依次透过第一二向色镜6、第二二向色镜7、第三二向色镜8;

[0065] 所述第二光源2发出的光线通过第三反射镜10后,经第一二向色镜6反射,再依次透过第二二向色镜7、第三二向色镜8;

[0066] 所述第三光源3发出的光线通过第五反射镜12后,经第二二向色镜7反射,再透过第三二向色镜8;

[0067] 所述第四光源4发出的光线通过第四反射镜11后,经第三二向色镜8反射,与来自其他三个激光器的光线合束后一起传输给声光可调谐滤波器13。

[0068] 这里示例性地,在其中一个实施例中,所述第一光源1、第二光源2、第三光源3、第四光源4采用激光器,波长分别为647nm、4561nm、488nm、405nm。

[0069] 需要指出的是,光源不限于激光器,也可以是LED光源,同时光波长不限于上述四种波长,光源之间没有先后或主次关系,可根据需求进行参数选择、数量增减或替换。

[0070] 进一步地,在其中一个实施例中,所述复合光场调控模块包括:

[0071] 光纤准直扩束组件,包括沿光源模块出射光线所在光轴依次设置的光纤准直器16、激光扩束器17、第一消色差二分之一波片18;

[0072] 第一光学调控装置,包括空间光调制器20、偏振分光棱镜19、傅里叶透镜21、多孔掩模板22、偏振旋转器23、液晶位相补偿器24、准直透镜25;

[0073] 第二光学调控装置,包括二维扫描振镜33、第二消色差二分之一波片34、偏振分光棱镜19、傅里叶透镜21、多孔掩模板22、偏振旋转器23、液晶位相补偿器24、准直透镜25;

[0074] 4f成像系统,包括傅里叶透镜21和准直透镜25,即傅里叶透镜21的后焦面与准直透镜25的前焦面重合;

[0075] 所述空间光调制器20和二维扫描振镜33均位于所述4f成像系统的前焦面;所述多孔掩模板22处于4f成像系统的傅里叶面;

[0076] 所述4f成像系统与荧光成像模块光学连接;

[0077] 所述复合光场调控模块实现结构光照明模式的过程:光纤准直扩束组件输出的光经偏振分光棱镜19透射入射至空间光调制器20,之后经空间光调制器20反射、偏振分光棱镜19反射后依次通过傅里叶透镜21、多孔掩模板22、偏振旋转器23、液晶位相补偿器24、准直透镜25;

[0078] 所述复合光场调控模块实现均匀照明模式的过程:光纤准直扩束组件输出的光经偏振分光棱镜19反射后依次通过第二消色差二分之一波片34、二维扫描振镜33,经二维扫描振镜33反射后依次通过第二消色差二分之一波片34、偏振分光棱镜19,再经偏振分光棱镜19透射后依次通过傅里叶透镜21、多孔掩模板22、偏振旋转器23、液晶位相补偿器24、准直透镜25。

[0079] 进一步地,在其中一个实施例中,所述空间光调制器20上加载了二元周期性条纹计算全息图,光线经空间光调制器20衍射到多个级次。改变空间光调制器20上加载图像的位相和空间取向,可改变样品面上的二维余弦照明光场的取向和位相。

[0080] 所述多孔掩模板22由2N个旋转对称分布的针孔构成,每个针孔为长方形结构,长边中心位置对应样品面全内反射临界角,其中N为整数。该多孔掩模板22用于实现空间滤波,仅允许满足特定入射角度的光线进入荧光成像模块照明样品,且从针孔不同位置通过的光线具有不同的入射角度;同时长方形结构使得入射角度在一定范围内可以调节,长方形中心位置对应全内反射临界角,当入射光束沿内侧通过针孔时可以实现对样本大角度入射照明,当入射光沿中心位置内侧改变位置时,可调节结构光场周期大小,实现对不同结构特征的样本以最优结构光照明;当入射光束沿外侧通过针孔时可以实现对样本全内反射照明,当入射光沿中心位置外侧改变位置时,可调节消逝波的穿透深度,实现对不同深度的样本进行照明。

[0081] 这里示例性地,图2(a)为6孔掩模板,由6个旋转对称分布的针孔构成;图2(c)-(e)为SIM成像模式下正负一级光束在显微物镜后瞳面的强度分布;图2(b)为STORM成像模式下,入射光束在显微物镜后瞳面的强度分布,这6个光斑是由1个光斑快速扫描形成的,扫描速度8kHz,远快于相机采集速度(小于100Hz),可等效地认为存在6个光斑同时照明。

[0082] 所述偏振旋转器23用于使从任意一个针孔通过的光束的偏振态都垂直于该针孔中心点与4f成像系统光轴所确定的平面(可使正负一级光束的偏振方向始终垂直于正负一级光束共同所在的平面);

[0083] 所述位相补偿器24的快轴方向与偏振分光棱镜19的透射光偏振方向平行,位相补偿器24用于主动补偿准直透镜25、透镜26、第四二向色镜29、显微物镜27等光学元件引起的激光位相漂移,位相补偿量、快轴与慢轴之间的相位差可通过计算机编程控制,当改变入射光的入射方位角,或改变入射光的波长时,同步地改变位相补偿量,使得最终到达样品面的任意一束光线的偏振态都保持为线偏振态,且偏振方向垂直该光线的入射面(偏振方向垂直于正负一级光束共同所在的平面),从而得到最大的结构光调制度,且由于所述相位漂移与激光波长相关,当激光波长改变时,需要改变液晶位相补偿器的位相补偿量,这对于使任意波长的结构光场都具有最大调制度非常重要,也是使本发明能够得到高质量SIM超分辨图像的关键设计。

[0084] 进一步地,在其中一个实施例中,所述第一消色差二分之一波片18安装在电动旋转波片架上,其快轴方向与偏振分光棱镜19透射光偏振方向夹角为 θ ,经偏振分光棱镜19透射照明液晶空间光调制器20的光强与 $\sin^2(2\theta)$ 成正比,经偏振分光棱镜19反射照明二维扫描振镜33的光强与 $\cos^2(2\theta)$ 成正比。

[0085] 进一步地,在其中一个实施例中,当 $\sin^2(2\theta) = 1, \cos^2(2\theta) = 0$ 时,复合光场调控模块独立工作在结构光照明模式;当 $\sin^2(2\theta) = 0, \cos^2(2\theta) = 1$ 时,复合光场调控模块独立工作在均匀照明模式;当 θ 等于其它值时,两种成像模式同时工作,且两种模式的相对照明光强可控。通过控制夹角 θ 的取值,可使复合光场调控模块在结构光照明模式和均匀照明模式之间相互切换,也可以使两种成像模式同时工作。

[0086] 进一步地,在其中一个实施例中,所述荧光成像模块包括两个相机,一个相机接收结构照明光场激发的荧光并成像,另一个相机接收均匀照明光场激发的荧光并成像,相机采集的原始图像经计算机重建超分辨图像,且两个相机的图像采集时序与复合光场调控模块和光源模块通过计算机同步控制。

[0087] 进一步地,在其中一个实施例中,所述荧光成像模块包括:

[0088] 实现结构光照明超分辨成像的装置,包括透镜26、显微物镜27、样品台28、第四二向色镜29、第五二向色镜37、第一管透镜31、第一相机32;复合光场调控模块的出射光透过透镜26后再经第四二向色镜29反射后照射放置于样品台28上的样品表面,产生余弦结构照明光场,激发样品发射荧光,激发的荧光经显微物镜27收集,之后依次经第四二向色镜29透射、第五二向色镜37透射、第一管透镜31后成像到第一相机32的探测面;

[0089] 实现均匀光照明超分辨成像的装置,包括透镜26、显微物镜27、样品台28、第四二向色镜29、第五二向色镜37、第二管透镜35、第二相机36;复合光场调控模块的出射光透过透镜26后再经第四二向色镜29反射后照射放置于样品台28上的样品表面,产生均匀照明光场,激发样品发射荧光,激发的荧光经显微物镜27收集,之后依次经第四二向色镜29透射、

第五二向色镜37反射、第二管透镜35后成像到第二相机36的探测面。

[0090] 这里,相机可以是EMCCD,SCMOS等二维图像探测器。

[0091] 这里,荧光成像模块既可以自主搭建,也可以采用商用显微镜。

[0092] 基于上述实施例,本发明系统实现结构光照明超分辨成像的步骤包括:使激光器出光且通过声光可调谐滤波器13进行波长选通及照明时序控制;在空间光调制器20上加载二元周期性条纹计算全息图,光线经液晶空间光调制器20衍射到多个级次,通过偏振分光棱镜19反射,再依次通过傅里叶透镜21、多孔掩模板22、偏振旋转器23、液晶位相补偿器24、准直透镜25以及荧光成像模块,照射到样品表面,使正负一级衍射光在样品面发生干涉(空间光调制器20衍射的光通过多孔掩模板滤波22,使得只有正负一级衍射光可以照射到样品面发生干涉),产生余弦结构照明光场,激发样品发射荧光;样品发射的荧光被荧光成像模块收集,通过第四二向色镜29透射、第五二向色镜37透射、第一管透镜31在相机32探测面成像。改变空间光调制器上加载图像的位相和空间取向,可改变样品面结构照明光场的取向和位相,并激发荧光获取图像。重复上述过程,采集3个方向角,3个位相的荧光图像,最终将相机采集的9张原始图像用图像处理算法重建出超分辨图像。

[0093] 本发明系统实现均匀光照明超分辨成像即随机光学重建照明超分辨率成像的步骤包括:通过二维扫描振镜33控制光线的传播方向,由二维扫描振镜33反射的光线依次通过第二消色差二分之一波片34、偏振分光棱镜19、傅里叶透镜21、多孔掩模板22、偏振旋转器23、液晶位相补偿器24、准直透镜25以及成像模块,照射到样品表面。入射角为 α ,使 α 大于全内反射临界角,入射光在样品表面处发生全内反射,在样品表面形成束消逝波照明光场,且样品发射的荧光被物镜收集,通过第四二向色镜29透射、第五二向色镜37反射、第二管透镜35在第二相机36的探测面上成像。

[0094] 所述随机光学重建照明超分辨率成像的步骤还包括,快速切换二维扫描振镜33的偏转方向,改变入射光的角向分布,在相机一次成像积分时间内,入射光的入射面沿显微物镜光轴旋转360度的整数倍,光线轨迹分布在顶角为 2α 的圆锥上,这样可使消逝波光场分布均匀,消除激光散斑对成像质量的负面影响。同时通过控制 α 角的大小,可以精确控制消逝波的穿透深度。

[0095] 示例性地,图3所示为本发明拍摄的超分辨图像,其中(a)为乳腺癌细胞HER2阳性信号SIM成像,(b)为乳腺癌细胞骨架STORM成像。

[0096] 进一步地,在其中一个实施例中,本发明系统还可以对样品进行双色标记,用一种波长的光源激发其中一种蛋白做结构光照明快速超分辨成像,而用另一种波长的光源激发第二种蛋白开展单分子随机光学重建超高分辨率成像。

[0097] 综合上述实施例,本发明提出的随机光学重建与结构光照明复合超分辨成像系统,包括提供多波长合束照明光线的光源模块、将光场调制为二维余弦结构照明光场和均匀照明光场的复合光场调控装置、采集荧光信号成像且重建超分辨图像的成像模块。通过声光可调谐滤波器对多波长合束光线的波长选通及时序控制,实现单一波长光线照明、多个波长光线交替照明、多个波长光线同时照明。通过空间光调制器将入射光线衍射到多个级次,经多孔掩模板滤波,只允许正负一级衍射光达到样品表面并干涉产生余弦结构光场;正负一级衍射光的偏振方向由偏振旋转器控制,始终垂直于其入射面;在偏振旋转器后面设置液晶位相补偿器,主动补偿光学元件引起的随机位相漂移,使最终达到样品面的光线

保持为线偏振且偏振方向垂直于入射面。通过二维扫描振镜快速扫描照明光线的方位角，在相机一次曝光时间内实现多角度入射平均，产生均匀照明光场，消除激光散斑对成像的不利影响。通过控制消色差二分之一波片的旋转角度，可以实现结构光场照明，或者均匀光场照明，或者结构光场与均匀光场同时照明但二者具有不同的波长。成像模块设置两个相机，结构光场照明激发的荧光用一个相机探测成像，均匀光场照明激发的荧光用另一个相机探测成像。

[0098] 综上，本发明系统具有以下特点：

[0099] 1、通过二维扫描振镜快速切换照明光的入射方位角，在相机一次曝光积分时间内使光线轨迹快速扫过以显微物镜光轴为轴线圆锥，样品接收的总照明光强等于不同角度入射的光线光强之和，因此激光随机散斑在求和过程中可以被有效抑制，进而在样品表面形成均匀的照明光场。同时通过二维扫描振镜还可以控制入射光的入射角度，从而控制消逝波照明光场的穿透深度。

[0100] 2、控制空间光调制器上加载的计算全息图，可以在样品面形成任意光强分布的结构照明光强。所述结构照明光场基于双光束干涉产生，系统中包含主动位相补偿器，可使入射光束始终保持为线偏振光，且偏振方向垂直与入射面，从而使结构光场获得最大的调制度。同时由于透镜、二向色镜、显微物镜等光学元件引入的激光位相漂移与激光波长相关，在改变入射波长时可通过液晶相位补偿器实时主动地调节位相补偿量，使得对于不同的波长始终实现最优调制度。

[0101] 3、随机光学重建/结构光照明复合超分辨成像方法：

[0102] a) 独立工作模式：本发明可独立开展STORM成像和SIM成像，或在二者之间快速切换。通过结构光照明成像对样品进行快速，大视场成像，找到感兴趣的重点区域，切换到随机光学重建模式，对该区域进行超高分辨率成像。这一点非常重要，在很多情况下，感兴趣的仅是样品中很小的一部分，并不需要对整个样品区域都进行超高分辨率成像，如何快速地定位重点区域，并对该区域超分辨成像是一个技术难点。本发明采用宽场结构光照明对整个样品快速高分辨成像，再通过二维扫描振镜使光线对重点区域快速扫描随机光学重建超高分辨率成像，解决了这一问题。

[0103] b) 同时工作模式：本发明能够同时对样品进行结构光照明超分辨成像和随机光学重建超分辨成像，能够采集更多的信息，完成单一成像方法无法开展的成像过程，例如对样品进行双色标记，用一种波长的激光激发其中一种蛋白做结构光照明快速超分辨成像，而用另一种波长的激光激发第二种蛋白开展单分子随机光学重建超高分辨率成像，这对于观察某些精确位点处的动力学过程很重要。

[0104] 本发明通过在一套光学成像平台实现随机光学重建与结构光照明两种超分辨成像技术联用，可实现对复杂生物体系的多模式、跨分辨率尺度同时成像。

[0105] 这里本发明的描述和应用是说明性的，并非想将本发明的范围限制在上述实施例中。这里所披露的实施例的变形和改变是可能的，对于那些本领域的普通技术人员来说实施例的替换和等效的各种部件是公知的。本领域技术人员应该清楚的是，在不脱离本发明的精神或本质特征的情况下，本发明可以以其它形式、结构、布置、比例，以及用其它组件、材料和部件来实现。在不脱离本发明范围和精神的条件下，可以对这里所披露的实施例进行其它变形和改变。本说明书中各个实施例采用递进的方式描述，每个实施例重点说明的

都是与其他实施例的不同之处,各个实施例之间相似部分互相参见即可。对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制与本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

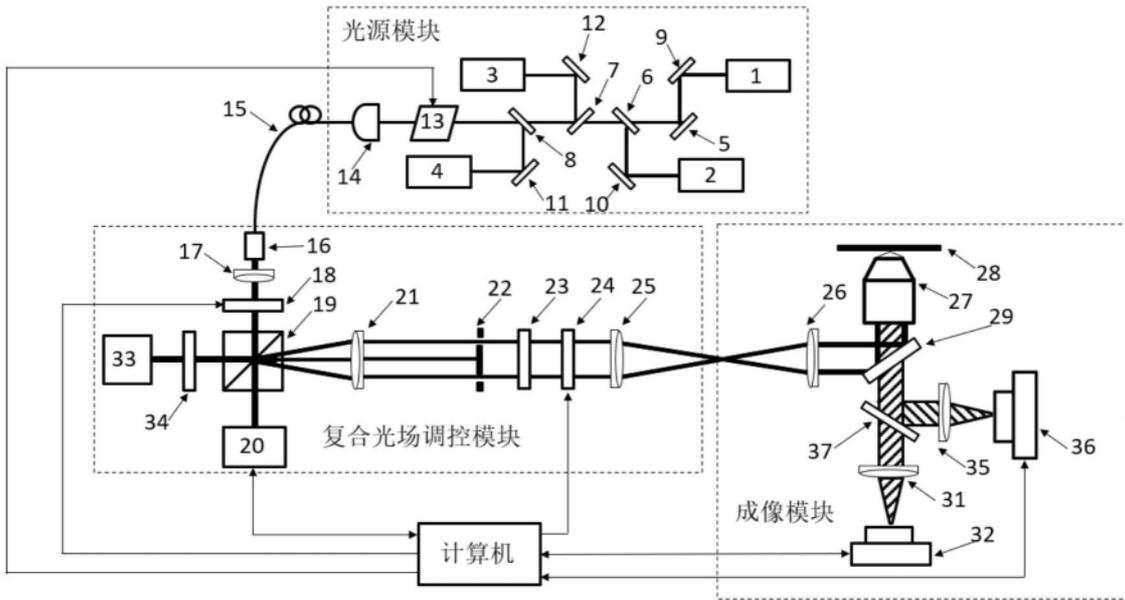


图1

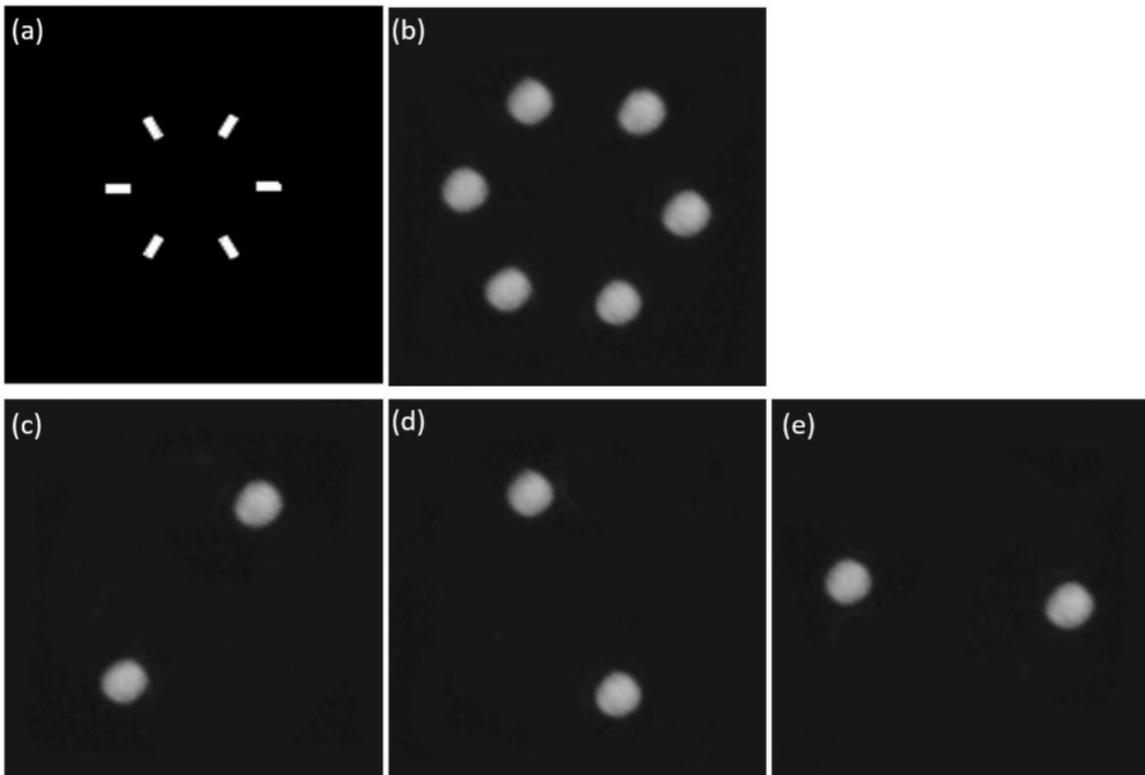


图2

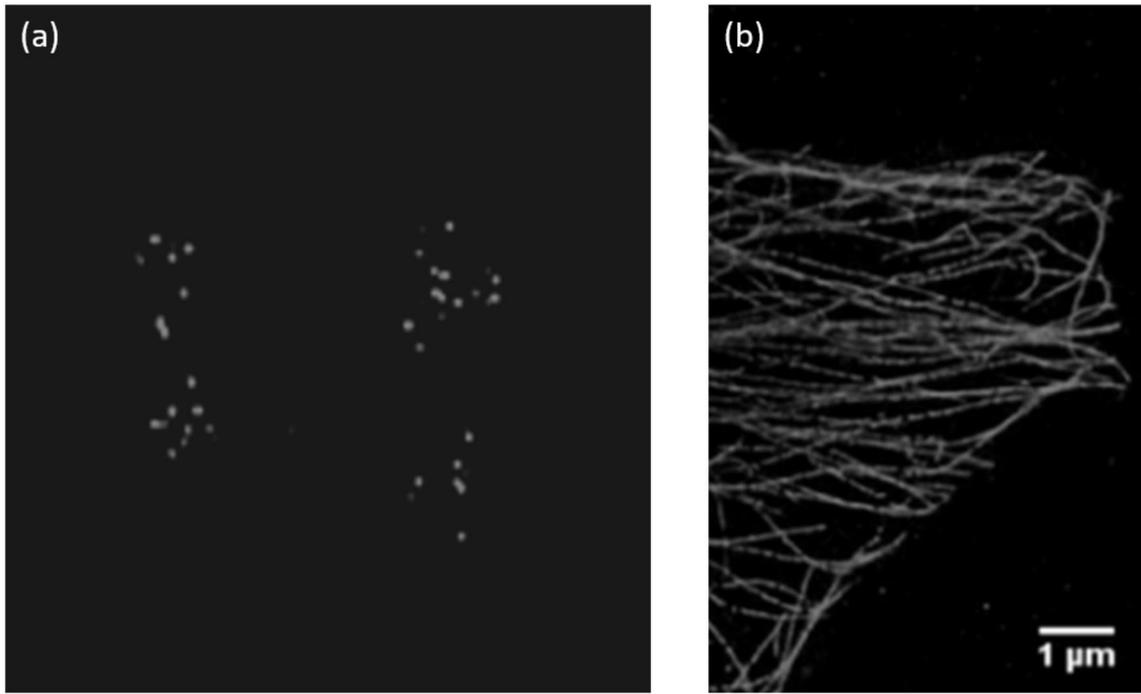


图3