

(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 7 月 9 日 (09.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/140283 A1

(51) 国际专利分类号:
G02B 21/00 (2006.01) **G01N 21/64** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/070468

(22) 国际申请日: 2019 年 1 月 4 日 (04.01.2019)

(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, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: IMAGING SYSTEM OF STIMULATED EMISSION LOSS MICROSCOPE

(54) 发明名称: 一种受激发射损耗显微镜的成像系统

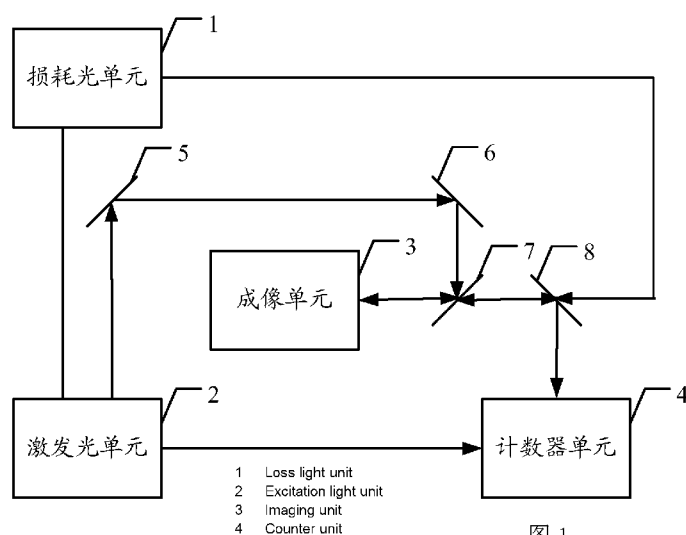


图 1

(57) Abstract: An imaging system of a stimulated emission loss microscope, the system comprising a loss light unit (1), an excitation light unit (2), an imaging unit (3) and a counter unit (4). The loss light unit (1) generates ring loss light and controls the light intensity and polarization of the ring loss light; the excitation light unit (2) is triggered by the loss light unit (1) to emit Gaussian excitation light; the Gaussian excitation light is divided into first Gaussian excitation light and second Gaussian excitation light by means of a third Glan prism (243); the ring loss light overlaps the first Gaussian excitation light and then the overlapped light is inputted into the imaging unit (3); and the imaging unit (3) scans and images a sample and collects a fluorescent signal. The second Gaussian type excitation light is used as a reference signal and enters, together with the fluorescence signal, the counter unit (4), thereby being used for fluorescence intensity imaging and fluorescence lifetime imaging. When low ring loss light energy is applied, the fluorescence lifetime of the sample

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))。

increases along with the laser irradiation time; and the saturation intensity of the fluorescent sample is reduced due to the increased fluorescence lifetime, so that the imaging resolution may be improved further.

(57) 摘要: 一种受激发射损耗显微镜的成像系统, 包括损耗光单元(1)、激发光单元(2)、成像单元(3)与计数器单元(4), 损耗光单元(1)产生环形损耗光并控制环形损耗光的光强和偏振, 激发光单元(2)被损耗光单元(1)触发后发出高斯型激发光, 高斯型激发光经过第三格兰棱镜(243)分为第一高斯型激发光与第二高斯型激发光, 环形损耗光与第一高斯型激发光重叠后输入成像单元(3), 成像单元(3)对样品进行扫描成像并收集荧光信号。第二高斯型激发光作为参考信号, 与荧光信号一并进入计数器单元(4), 用于荧光强度成像和荧光寿命成像。当施加较低的环形损耗光能量时, 样品的荧光寿命随着激光照射时间而增加, 增加的荧光寿命降低了荧光样品的饱和强度, 进而可以实现成像分辨率的进一步提高。

一种受激发射损耗显微镜的成像系统

技术领域

[0001] 本发明涉及光学显微镜成像领域，尤其涉及一种受激发射损耗显微镜的成像系统。

背景技术

[0002] 在光学系统中，物点经成像系统后形成的像斑称为点扩展函数(Point Spread Function, PSF)。点扩展函数描述了成像系统对物点的解析能力，是判断光学系统成像分辨率高低的重要依据。受衍射极限的限制，当物平面中两个物点距离较近时，它们经过光学系统形成两个重叠的像斑。像斑之间的距离与物点间的距离相对应，当像斑相距较远时，其点扩展函数相互分离，则容易被分辨；当像斑相距很近时，两个PSF高度重叠，进而无法区分各自的像斑；而当像斑间的距离介于两者之间时，PSF部分重叠，此时的像斑处于可分辨和不可分辨之间，处于一个临界距离，小于该距离时像斑叠加后将变得无法区分。该临界距离的确定通常采用瑞利判据，即以一个像斑的中心与另一个像斑的第一暗环重合作为区分标准，此时两像斑中心距离等于艾里斑半径，艾里斑半径的大小与光波波长和物镜的数值孔径有关。

[0003] 19世纪末，德国物理学家Ernst K. Abbe根据几何光学中的正弦条件，确定了光学显微镜的分辨率极限在可见光波长的一半左右。这意味着通过传统的光学显微镜可以分辨出单个细胞，以及细胞内的细胞器成分，却无法分辨尺寸更小的物体，比如更小尺寸的病毒、单个的蛋白质或者其他小分子物质。1994年，德国科学家Stefan W.Hell提出了受激发射损耗显微技术(Stimulated Emission Depletion, STED)，使光学显微镜的分辨率提高了一个数量级，这一杰出的工作使他在2014年获得了诺贝尔化学奖。原则上说，所有的光学超分辨技术都是围绕着如何得到一个尺寸更小的点扩展函数而展开的。Stefan W.Hell提出的受激发射损耗显微技术是一个纯物理的超分辨技术。一个典型的STED超分辨系统中需要两束光：一束为激发光，另一束为损耗光。STED超分辨技术的核心思想是利

用受激发射选择性损耗激发光斑中边沿区域的激发态荧光分子，从而减少有效荧光的发光范围，压缩有效PSF尺度来提高系统分辨率。

- [0004] 普通的STED显微镜只能采集荧光强度信号，而忽略了荧光分子的其他信息。在STED显微镜技术中，为了提高成像分辨率，需要对样品施加极高的激光功率（>100 mW），而过高的损耗激光功率会损伤样品，并使荧光分子发生光漂白效应，因此限制了其在活细胞成像等方面的应用，是STED显微镜最大的缺点之一。。

发明概述

技术问题

- [0005] 本发明的主要目的在于提供一种受激发射损耗显微镜的成像系统，可以解决现有技术中为了提高成像分辨率而使用过高的损耗激光，从而影响样品寿命的技术问题。

问题的解决方案

技术解决方案

- [0006] 为实现上述目的，本发明提供一种受激发射损耗显微镜的成像系统，其特征在于，所述系统包括损耗光单元、激发光单元、成像单元与计数器单元；
- [0007] 所述损耗光单元用于产生预设脉冲频率的环形损耗光并调节控制所述环形损耗光的光强，所述环形损耗光的激光波前为环形；
- [0008] 所述损耗光单元与所述激发光单元连接，所述激发光单元用于在所述损耗光单元的触发下产生所述脉冲频率的高斯型激发光，并将所述高斯型激发光分为第一高斯型激发光与第二高斯型激发光，所述高斯型激发光的激光波前为高斯型，所述高斯型激发光与所述环形损耗光之间的脉冲峰值间隔为预设脉冲间隔值；
- [0009] 所述环形损耗光与所述第一高斯型激发光汇合重叠后输入所述成像单元，所述成像单元用于对样品进行面阵扫描成像并收集所述样品反射的荧光信号，所述荧光信号和所述第二高斯型激发光分别射入所述计数器单元，所述计数器单元用于基于所述荧光信号和所述第二高斯型激发光进行荧光强度成像和荧光寿命成像。

发明的有益效果

有益效果

[0010] 本发明提供一种受激发射损耗显微镜的成像系统，该成像系统中损耗光单元产生环形损耗光并调节控制环形损耗光的光强，使环形损耗光的功率值保持在较低的水平。低功率的环形损耗光能增加样品中的荧光寿命，且随着激光照射时间的增加，样品的图像分辨率也随着荧光寿命的增加而逐渐提高。

对附图的简要说明

附图说明

[0011] 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。

[0012] 图1为本发明实施例中一种受激发射损耗显微镜的成像系统的结构示意图；

[0013] 图2为本发明实施例中损耗光单元1的结构示意图；

[0014] 图3为本发明实施例中激发光单元2的结构示意图；

[0015] 图4为本发明实施例中成像单元3的结构示意图；

[0016] 图5为本发明实施例中计数器单元4的结构示意图；

[0017] 图6为本发明实施例中高斯型激发光光斑、环形损耗光光斑及二者光斑空间重叠的结构示意图；

[0018] 图7为本发明实施例中共聚焦成像模式下荧光珠在激光长时间扫描区域和首次扫描区域的寿命对比示意图；

[0019] 图8为本发明实施例中STED成像模式下荧光珠在激光长时间扫描区域和首次扫描区域的寿命对比示意图。

发明实施例

本发明的实施方式

[0020] 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。

[0021] 由于现有技术中存在为了提高成像分辨率而使用过高的损耗激光，从而影响样品寿命的技术问题。

[0022] 为了解决上述技术问题，本发明提出一种受激发射损耗显微镜的成像系统，该成像系统中损耗光单元产生环形损耗光并调节控制环形损耗光的光强，使环形损耗光的功率值保持在较低的水平。低功率的环形损耗光能增加样品中的荧光寿命，且随着激光照射时间的增加，样品的图像分辨率也随着荧光寿命的增加而逐渐提高。

[0023] 请参阅图1，为本发明实施例中一种受激发射损耗显微镜的成像系统的结构示意图，其中，箭头表示激光的传输方向。

[0024] 该系统包括损耗光单元1、激发光单元2、成像单元3与计数器单元4；

[0025] 损耗光单元1用于产生预设脉冲频率的环形损耗光并调节控制环形损耗光的光强，环形损耗光的激光波前为环形；

[0026] 损耗光单元1与激发光单元2连接，激发光单元2用于在损耗光单元1的触发下产生脉冲频率的高斯型激发光，并将高斯型激发光分为第一高斯型激发光与第二高斯型激发光，高斯型激发光的激光波前为高斯型，高斯型激发光与环形损耗光之间的脉冲峰值间隔为预设脉冲间隔值；

[0027] 环形损耗光与第一高斯型激发光汇合重叠后输入成像单元3，成像单元3用于对样品进行面阵扫描成像并收集样品反射的荧光信号，荧光信号和第二高斯型激发光分别射入计数器单元4，计数器单元4用于基于荧光信号和第二高斯型激发光进行荧光强度成像和荧光寿命成像。

[0028] 优选的，环形损耗光的波长为760纳米，第一高斯型激发光、第二高斯型激发光及高斯型激发光的波长均为635纳米。

[0029] 优选的，高斯型激发光与环形损耗光之间的脉冲峰值间隔为预设脉冲间隔值，该脉冲间隔值保持在200ps左右的范围，这样才能保证环形损耗光更彻底地将高斯型激发光产生的激发态电子以受激辐射的形式返回到基态。

- [0030] 需要说明的是，普通的STED显微镜只能采集荧光强度信号，本发明采用荧光寿命显微镜(Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM)，用FLIM来描述荧光寿命空间分布，可以应用于固定细胞和活细胞的成像中，来揭示更多的生物信息（如细胞内微环境的变化）。本发明的受激发射损耗显微镜的成像系统是结合FLIM技术与STED技术从荧光信号中提取荧光强度和荧光寿命的信息，进而实现具有超分辨信息的荧光寿命成像，即STED-FLIM图像。本发明中的受激发射损耗显微镜的成像系统是可同时收集荧光强度和荧光寿命信息的超分辨成像系统，旨在研究激光强度和照射时间对荧光寿命和成像分辨率的影响，属于STED超分辨显微成像系统，能显著提高系统空间分辨率。
- [0031] 进一步的，该系统还包括第二反射镜5、第三反射镜6、第一双色镜7和第二双色镜8；
- [0032] 第一高斯型激发光依次经过第二反射镜5反射、第三反射镜6反射及第一双色镜7反射，环形损耗光依次经过第二双色镜8透射和第一双色镜7透射，经过第一双色镜7透射的环形损耗光与经过第一双色镜7反射的第一高斯型激发光汇合重叠后射入成像单元3；
- [0033] 荧光信号依次经过第一双色镜透射7和第二双色镜8反射后，射入计数器单元4。
- [0034] 需要说明的是，第二反射镜5和第三反射镜6用于反射入射光，改变光束的传播方向。第一双色镜7不仅用于反射第一高斯型激发光，透射环形损耗光，还用于微调第一高斯型激发光的传输方向，使第一高斯型激发光和环形损耗光能够很好的汇合重叠。第二双色镜8用于透射环形损耗光，同时反射荧光信号。
- [0035] 进一步的，请参阅图2，为本发明实施例中损耗光单元1的结构示意图，其中，箭头表示光的传输方向。损耗光单元1包括飞秒激光器11、第一调节单元12、脉冲展宽单元13、第二调节单元14和螺旋相位板15；
- [0036] 飞秒激光器1用于产生脉冲频率的飞秒脉冲型损耗光，飞秒脉冲型损耗光射入第一调节单元12，经第一调节单元12进行线偏振调节和光强调节后输出第一线偏振损耗光，第一线偏振损耗光射入脉冲展宽单元13，经脉冲展宽单元13进行脉冲展宽后输出预设脉冲宽度的展宽损耗光，展宽损耗光射入第二调节单元14

，经第二调节单元14进行线偏振调节和光强调节后输出第二线偏振损耗光，第二线偏振损耗光经过螺旋相位板15后输出环形损耗光；

[0037] 飞秒激光器11与激发光单元2连接，飞秒激光器11还用于触发激发光单元2产生高斯型激发光。

[0038] 需要说明的是，螺旋相位板15（VortexPhase Plate，VPP）用于将损耗光的波前由高斯型转换成环形。

[0039] 进一步的，第一调节单元12包括第一半波片121和第一格兰棱镜122；

[0040] 飞秒脉冲型损耗光射入第一半波片121，经第一半波片121调节为预设第一偏振方向的线偏振光后射入第一格兰棱镜122，经第一格兰棱镜122调节光强后输出第一线偏振损耗光。

[0041] 需要说明的是，第一半波片121用于将飞秒脉冲型损耗光调节为线偏振光并调整其偏振方向，搭配第一格兰棱镜122，控制激光的强度。

[0042] 进一步的，脉冲展宽单元13包括玻璃棒131、第一透镜132、单模保偏光纤133和第二透镜134；

[0043] 第一线偏振损耗光射入玻璃棒131，经玻璃棒131进行脉冲展宽后射入第一透镜132，经第一透镜132聚焦后射入单模保偏光纤133，经单模保偏光纤133进行脉冲再次展宽后射入第二透镜134，经第二透镜134聚焦后输出展宽损耗光。

[0044] 需要说明的是，玻璃棒131（Glass Rod，GR）用于将第一线偏振损耗光的脉冲展宽至约1皮秒，单模保偏光纤133（Polarization Maintaining Fiber，PMF）为100米单模保偏光纤，用于进一步展宽损耗光，使其脉冲宽度达到200皮秒左右。

[0045] 进一步的，第二调节单元14包括第二半波片141和第二格兰棱镜142；

[0046] 展宽损耗光射入第二半波片141，经第二半波片141调节为预设第二偏振方向的线偏振光后射入第二格兰棱镜142，经第二格兰棱镜142调节光强后输出第二线偏振损耗光。

[0047] 需要说明的是，第二半波片141用于将展宽损耗光调节为线偏振光并调整其偏振方向，搭配第二格兰棱镜142，控制激光的强度。

[0048] 优选的，飞秒脉冲型损耗光由飞秒激光器1产生，首先通过第一半波片121和第

一格兰棱镜122，用来调节损耗光的线偏振方向和激光强度，确保进入光路系统的损耗光为线偏振光。玻璃棒131用于将飞秒级的损耗脉冲光进行展宽，展宽后的脉冲宽度约为1皮秒。光束经第一透镜132聚焦后耦合进入100米单模保偏光纤，将损耗光的脉冲宽度进一步展宽至约200皮秒。出射光束经第二透镜134扩束后进入第二半波片141和第二格兰棱镜142，再一次对损耗光的偏振特性和强度进行调节。光束经过螺旋相位板15之后，波前由高斯型转变为环形。

[0049] 进一步的，请参阅图3，为本发明实施例中激发光单元2的结构示意图，其中，箭头表示光的传输方向。

[0050] 激发光单元2包括皮秒激光器21、单模光纤22、第三透镜23和调节控制单元24；

[0051] 皮秒激光器21与损耗光单元1连接，皮秒激光器21用于在损耗光单元1的触发下产生脉冲频率的皮秒脉冲型激发光，皮秒脉冲型激发光射入单模光纤22，经单模光纤22进行模式调控后射入第三透镜23，经第三透镜23进行放大后射入调节控制单元24，经调节控制单元24进行线偏振调节、脉冲间隔调节和光强调节后输出激光波前为高斯型的高斯型激发光。

[0052] 需要说明的是，单模光纤22(Single Mode Fiber, SMF)主要用于对皮秒激光器21中出射的激发光进行模式调控。

[0053] 进一步的，调节控制单元24包括第三半波片241、角反射器242和第三格兰棱镜243；

[0054] 经第三透镜23放大后的激光射入第三半波片241，经第三半波片241调节为预设第三偏振方向的线偏振光后经过角反射器242，角反射器242用于调节高斯型激发光与环形损耗光之间的脉冲间隔，经角反射器242进行脉冲间隔调节后的激光射入第三格兰棱镜243，经第三格兰棱镜243调节光强后，分别输出第一高斯型激发光和第二高斯型激发光。

[0055] 需要说明的是，角反射器242(Retro Reflector, RR)可改变激发光的光路，用于在时间上控制激发光和损耗光之间的脉冲间隔，一般的，改变激发光的光路通常为延长激发光的光路或者缩短激发光的光路，同时，第三半波片241用于将展宽损耗光调节为线偏振光并调整其偏振方向，搭配第三格兰棱镜243，控制激光

的强度，同时，第三格兰棱镜243将高斯型激发光分成两路，分别为第一高斯型激发光和第二高斯型激发光。

[0056] 激发光由皮秒激光器21产生，被损耗激光信号触发后发出相同重复频率的激光。通过单模光纤22耦合，由第三透镜23放大并依次入射第三半波片241、角反射器242和第三格兰棱镜243，调节激发光的偏振特性和强度，确保进入光路系统的激发光为线偏振光。激发光通过角反射器242来改变光路的光程，从而控制激发光和损耗光之间的脉冲间隔。

[0057] 进一步的，请参阅图4，为本发明实施例中成像单元3的结构示意图，其中，箭头表示光的传输方向。

[0058] 成像单元3包括第四透镜31、振镜扫描系统32、第五透镜33、四分之一玻片34、高数值孔径物镜35和载物台36，载物台36上放置样品；

[0059] 环形损耗光与第一高斯型激发光汇合重叠后依次经过第四透镜31、振镜扫描系统32和第五透镜33后，射入四分之一玻片34，经四分之一玻片34将汇合重叠后的第一高斯型激发光和环形损耗光由线偏振光调节为圆偏振光后，经过高数值孔径物镜35后入射至载物台36；

[0060] 高数值孔径物镜35用于收集样品反射的荧光信号，荧光信号依次经过四分之一玻片34、第五透镜33、振镜扫描系统32、第四透镜31后射入计数器单元5；

[0061] 振镜扫描系统32用于对汇合重叠后的第一高斯型激发光和环形损耗光进行同步扫描，实现对样品的面阵扫描成像。

[0062] 需要说明的是，高数值孔径物镜35的放大倍率为100倍，数值孔径为1.4，用于聚焦重叠的第一高斯型激发光和环形损耗光，同时收集样品反射回来的荧光信号。四分之一玻片34（Quarter-Wave Plate, QWP）用于将环形损耗光由线偏振光转化成圆偏振光，以确保环形损耗光具有更好的光斑质量。其中，环形损耗光经第四透镜31和第五透镜33将光斑直径放大至等于或略大于高倍数值孔径物镜35的孔径，并将入射的平行光聚焦到载物台36的样品上。

[0063] 进一步的，请参阅图5，为本发明实施例中计数器单元4的结构示意图，其中，箭头表示光的传输方向。

[0064] 计数器单元4包括第六透镜41、滤镜42、多模光纤43、光电倍增管44、第一反

射镜45、第七透镜46、探测器47和时间相关单光子计数器48；

[0065] 荧光信号依次经过第六透镜41透射、滤镜42滤除杂散光及多模光纤43后，射入光电倍增管44，光电倍增管44将荧光信号放大后输入时间相关单光子计数器48

；

[0066] 第二高斯型激发光经过第一反射镜45反射和第七透镜46透射后，射入探测器47，经探测器47转化成电信号后输入时间相关单光子计数器48；

[0067] 时间相关单光子计数器48用于基于第二高斯型激发光和荧光信号进行荧光强度成像和荧光寿命成像。

[0068] 需要说明的是，滤镜42用于透过所要收集波段的荧光信号，并过滤此波段以外的杂散光，多模光纤43，用于将收集到的荧光信号传输给光电倍增管44，多模光纤43的光纤纤芯可作为小孔，接收第六透镜41聚焦的荧光信号，并排除杂散光的影响。探测器47用于探测第二高斯型激发光脉冲，作为测量样品荧光寿命的参考信号，时间相关单光子计数器48能将光电倍增管44收集到的荧光信号分为两路，一路用于荧光强度成像，另一路用于荧光寿命成像。

[0069] 为更好的理解本发明，请参阅图6，为本发明实施例中高斯型激发光光斑、环形损耗光光斑及二者光斑空间重叠的结构示意图。其中图6中a表示高斯型激发光光斑，b表示环形损耗光光斑，c表示高斯型激发光光斑和环形损耗光光斑的空间重叠示意图。

[0070] 进一步的，请参照图7，为本发明实施例中共聚焦成像模式下荧光珠在激光长时间扫描区域和首次扫描区域的寿命对比示意图。在共聚焦成像模式下形成的Confocal-FLIM图像中，中心虚线区域为经激光长时间照射的成像区域，而其余部分为首次扫描成像区域。t表示整个区域的平均寿命，t1表示外围区域的寿命，t2表示中心区域的寿命。在寿命图像中，中心区域的荧光寿命高于外围区域的荧光寿命，说明了荧光珠的寿命在长时间的激光照射下向长寿命变化。虽然对样品进行长时间照射后光漂白会导致荧光强度的降低，但是激发光强度只有微瓦量级，因此强度的变化并不明显。

[0071] 进一步的，请参照图8，为本发明实施例中STED成像模式下荧光珠在激光长时间扫描区域和首次扫描区域的寿命对比示意图。在STED成像模式下形成的STE

D-FLIM图像中，中心虚线区域为经激光长时间照射的成像区域，而其余部分为首次扫描成像区域。T表示整个区域的平均寿命，T1表示外围区域的寿命，T2表示中心区域的寿命。在STED成像模式下，长时间的激光照射会使扫描区域内荧光珠的寿命发生更加明显的变化，中心区域荧光珠呈现出的颜色更深，其寿命远高于外围区域的荧光寿命。由于损耗激光能量较高，长时间激光照射增加了荧光团的光漂白率，进而降低了自发荧光的光子数，因此中心扫描区域与外围扫描区域的荧光强度不同。

[0072] STED超分辨成像技术需要用到损耗光与激发光，其分辨率随着损耗光能量的增加而提高，由公式表示为： $R=\lambda/[2NA(1+I_{\text{STED}}/I_s)^{1/2}]$ ，其中 $I_s=hc/\lambda\tau\sigma$ ， λ 为光波波长，NA为物镜的数值孔径， I_{STED} 为损耗激光的能量， I_s 为样品的饱和能量，由所用样品的荧光寿命(τ)和损耗光的吸收截面(σ)共同决定。因此，在固定的损耗激光能量下，荧光寿命的增加会导致饱和功率的降低，这也意味着可以在较低激光能量下实现分辨率的提升。在Confocal图像中，由于衍射极限的限制，许多荧光珠相距很近而无法被区分。当施加较低功率的损耗激光后，图像分辨率相比共聚焦图像略有提高。在STED成像模式下增加激光的照射时间，图像分辨率随着荧光寿命的增加而逐渐提高。因此在本系统中，能利用增加荧光寿命的方法在低功率下实现STED成像分辨率的进一步提升。

[0073] 在本发明实施例中，该成像系统中损耗光单元1产生环形损耗光并调节控制环形损耗光的光强，使环形损耗光的功率值保持在较低的水平。当环形损耗光能量较低时，样品的荧光寿命随着激光照射时间的增加而逐渐增加，增加的荧光寿命降低了荧光样品的饱和强度，进而样品的图像分辨率也随着荧光寿命的增加而逐渐提高。

序列表自由内容

[0074] 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。

[0075] 以上为对本发明所提供的一种受激发射损耗显微镜的成像系统的描述，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] 一种受激发射损耗显微镜的成像系统，其特征在于，所述系统包括损耗光单元、激发光单元、成像单元与计数器单元；
- 所述损耗光单元用于产生预设脉冲频率的环形损耗光并调节控制所述环形损耗光的光强，所述环形损耗光的激光波前为环形；
- 所述损耗光单元与所述激发光单元连接，所述激发光单元用于在所述损耗光单元的触发下产生所述脉冲频率的高斯型激发光，并将所述高斯型激发光分为第一高斯型激发光与第二高斯型激发光，所述高斯型激发光的激光波前为高斯型，所述高斯型激发光与所述环形损耗光之间的脉冲峰值间隔为预设脉冲间隔值；
- 所述环形损耗光与所述第一高斯型激发光汇合重叠后输入所述成像单元，所述成像单元用于对样品进行面阵扫描成像并收集所述样品反射的荧光信号，所述荧光信号和所述第二高斯型激发光分别射入所述计数器单元，所述计数器单元用于基于所述荧光信号和所述第二高斯型激发光进行荧光强度成像和荧光寿命成像。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的成像系统，其特征在于，所述损耗光单元包括飞秒激光器、第一调节单元、脉冲展宽单元、第二调节单元和螺旋相位板；
- 所述飞秒激光器用于产生所述脉冲频率的飞秒脉冲型损耗光，所述飞秒脉冲型损耗光射入所述第一调节单元，经所述第一调节单元进行线偏振调节和光强调节后输出第一线偏振损耗光，所述第一线偏振损耗光射入所述脉冲展宽单元，经所述脉冲展宽单元进行脉冲展宽后输出预设脉冲宽度的展宽损耗光，所述展宽损耗光射入所述第二调节单元，经所述第二调节单元进行线偏振调节和光强调节后输出第二线偏振损耗光，所述第二线偏振损耗光经过所述螺旋相位板后输出所述环形损耗光；
- 所述飞秒激光器与所述激发光单元连接，所述飞秒激光器还用于触发所述激发光单元产生所述高斯型激发光。

- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的成像系统，其特征在于，所述第一调节单元包括第一半波片和第一格兰棱镜；
所述飞秒脉冲型损耗光射入所述第一半波片，经所述第一半波片调节为预设第一偏振方向的线偏振光后射入所述第一格兰棱镜，经所述第一格兰棱镜调节光强后输出所述第一线偏振损耗光。
- [权利要求 4] 根据权利要求2所述的成像系统，其特征在于，所述脉冲展宽单元包括玻璃棒、第一透镜、单模保偏光纤和第二透镜；
所述第一线偏振损耗光射入所述玻璃棒，经所述玻璃棒进行脉冲展宽后射入所述第一透镜，经所述第一透镜聚焦后射入所述单模保偏光纤，经所述单模保偏光纤进行脉冲再次展宽后射入所述第二透镜，经所述第二透镜聚焦后输出所述展宽损耗光。
- [权利要求 5] 根据权利要求2所述的成像系统，其特征在于，所述第二调节单元包括第二半波片和第二格兰棱镜；
所述展宽损耗光射入所述第二半波片，经所述第二半波片调节为预设第二偏振方向的线偏振光后射入所述第二格兰棱镜，经所述第二格兰棱镜调节光强后输出所述第二线偏振损耗光。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的成像系统，其特征在于，所述激发光单元包括皮秒激光器、单模光纤、第三透镜和调节控制单元；
所述皮秒激光器与所述损耗光单元连接，所述皮秒激光器用于在所述损耗光单元的触发下产生所述脉冲频率的皮秒脉冲型激发光，所述皮秒脉冲型激发光射入所述单模光纤，经所述单模光纤进行模式调控后射入所述第三透镜，经所述第三透镜进行放大后射入所述调节控制单元，经所述调节控制单元进行线偏振调节、脉冲间隔调节和光强调节后输出激光波前为高斯型的高斯型激发光。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的成像系统，其特征在于，所述调节控制单元包括第三半波片、角反射器和第三格兰棱镜；
经所述第三透镜放大后的激光射入所述第三半波片，经所述第三半波片调节为预设第三偏振方向的线偏振光后经过所述角反射器，所述角

反射器用于调节所述高斯型激发光与所述环形损耗光之间的脉冲间隔，经所述角反射器进行脉冲间隔调节后的激光射入所述第三格兰棱镜，经所述第三格兰棱镜调节光强后，分别输出所述第一高斯型激发光和所述第二高斯型激发光。

[权利要求 8]

根据权利要求1所述的成像系统，其特征在于，所述成像单元包括第四透镜、振镜扫描系统、第五透镜、四分之一玻片、高数值孔径物镜和载物台，所述载物台上放置所述样品；

所述环形损耗光与所述第一高斯型激发光汇合重叠后依次经过所述第四透镜、所述振镜扫描系统和所述第五透镜后，射入所述四分之一玻片，经所述四分之一玻片将汇合重叠后的所述第一高斯型激发光和所述环形损耗光由线偏振光调节为圆偏振光后，经过所述高数值孔径物镜后入射至所述载物台；

所述高数值孔径物镜用于收集所述样品反射的荧光信号，所述荧光信号依次经过所述四分之一玻片、所述第五透镜、所述振镜扫描系统、所述第四透镜后射入所述计数器单元；

所述振镜扫描系统用于对汇合重叠后的所述第一高斯型激发光和所述环形损耗光进行同步扫描，实现对所述样品的面阵扫描成像。

[权利要求 9]

根据权利要求1所述的成像系统，其特征在于，所述计数器单元包括第六透镜、滤镜、多模光纤、光电倍增管、第一反射镜、第七透镜、探测器和时间相关单光子计数器；

所述荧光信号依次经过所述第六透镜透射、所述滤镜滤除杂散光及所述多模光纤后，射入所述光电倍增管，所述光电倍增管将所述荧光信号放大后输入所述时间相关单光子计数器；

所述第二高斯型激发光经过所述第一反射镜反射和所述第七透镜透射后，射入所述探测器，经所述探测器转化成电信号后输入所述时间相关单光子计数器；

所述时间相关单光子计数器用于基于所述第二高斯型激发光和所述荧光信号进行荧光强度成像和荧光寿命成像。

[权利要求 10] 根据权利要求1-9任意一项所述的成像系统，其特征在于，所述系统还包括第二反射镜、第三反射镜、第一双色镜和第二双色镜；

所述第一高斯型激发光依次经过所述第二反射镜反射、所述第三反射镜反射及所述第一双色镜反射，所述环形损耗光依次经过所述第二双色镜透射和所述第一双色镜透射，经过所述第一双色镜透射的所述环形损耗光与经过所述第一双色镜反射的所述第一高斯型激发光汇合重叠后射入所述成像单元；

所述荧光信号依次经过所述第一双色镜透射和所述第二双色镜反射后，射入所述计数器单元。

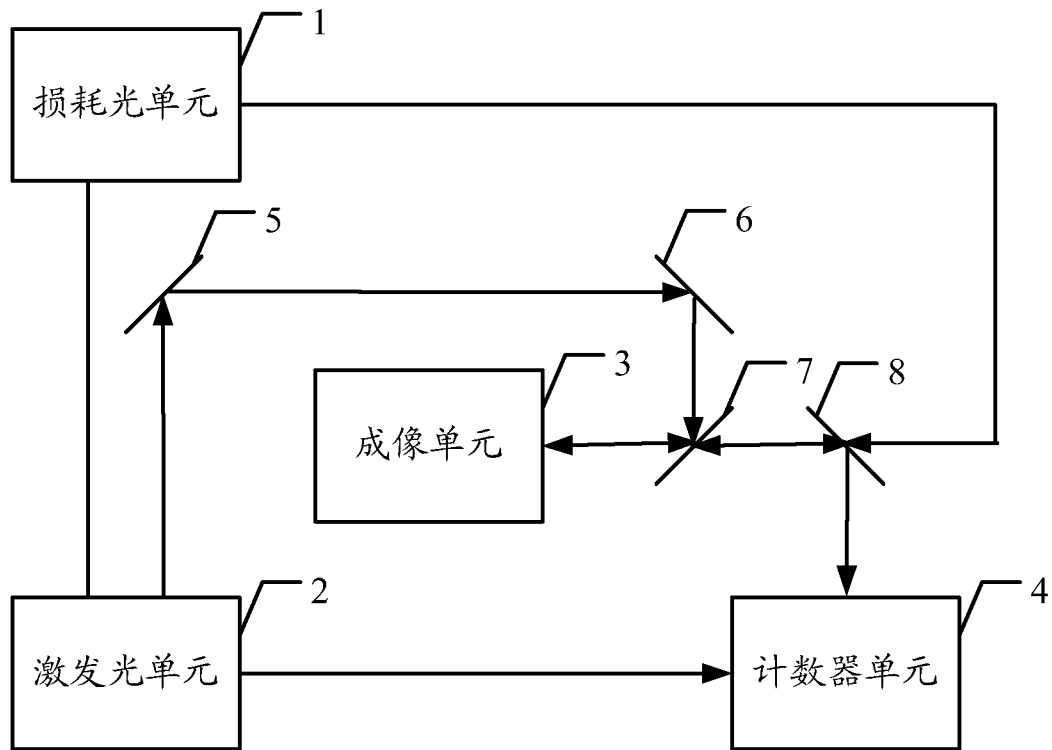


图 1

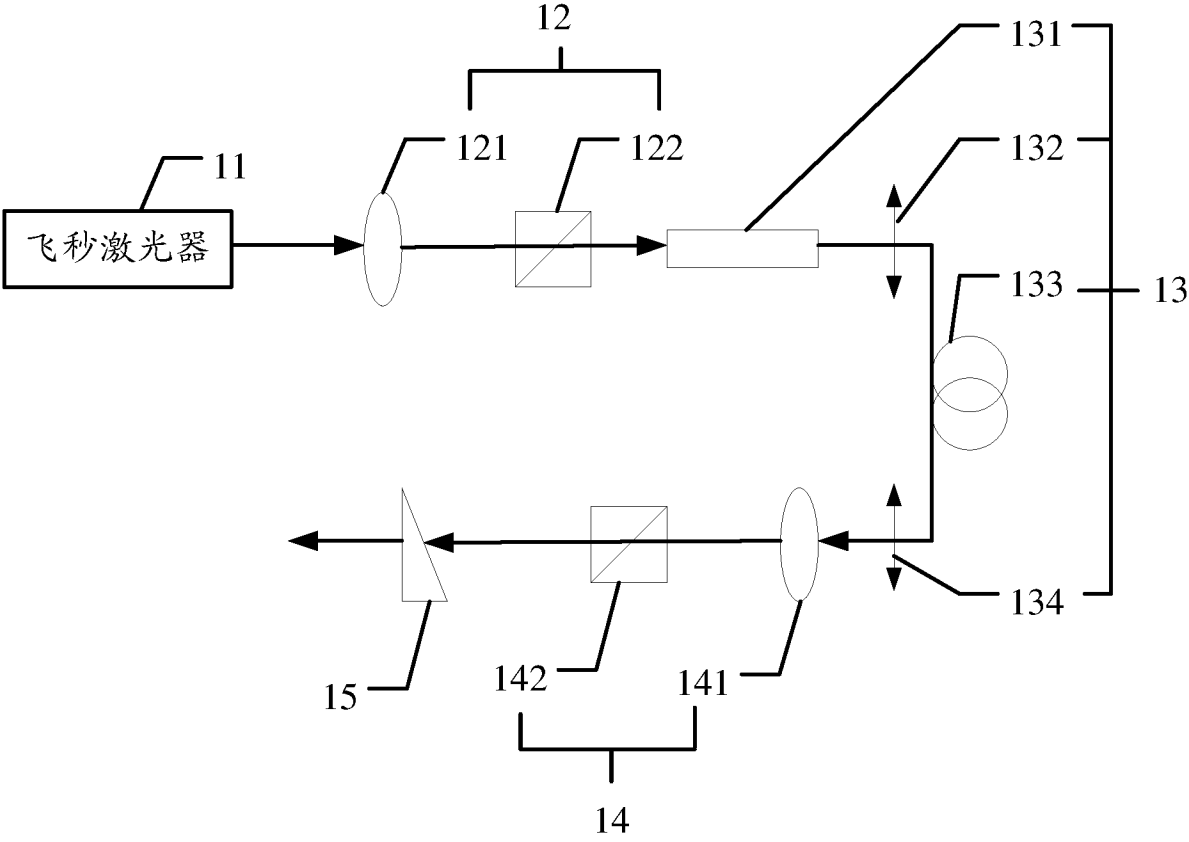


图 2

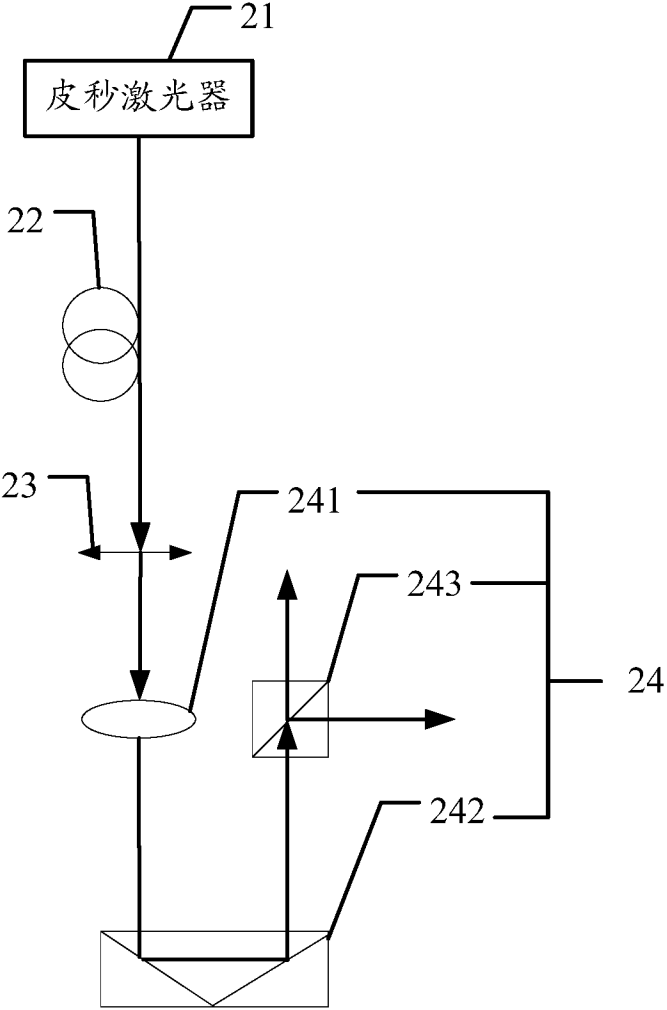


图 3

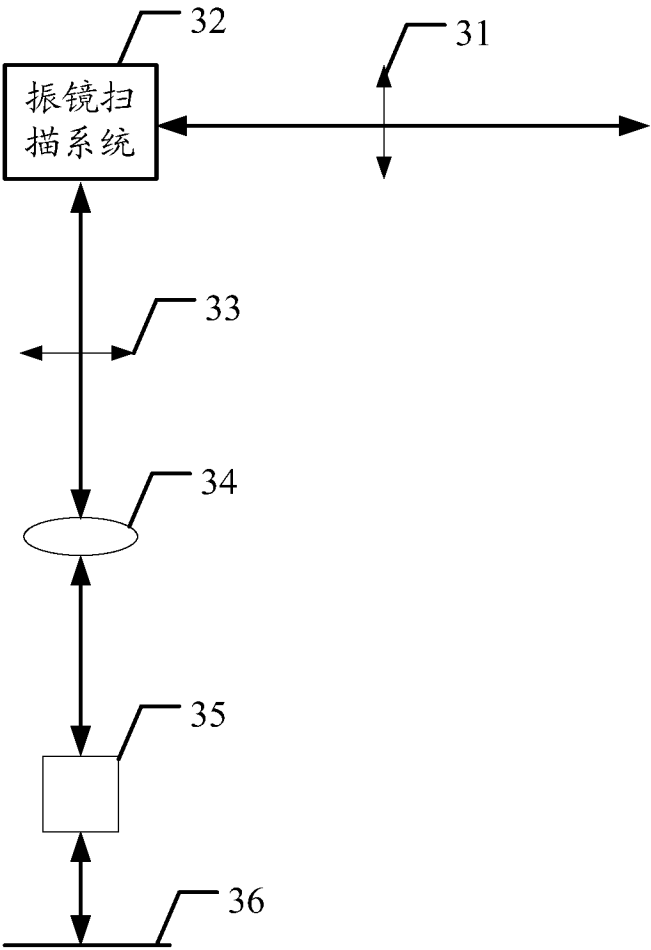


图 4

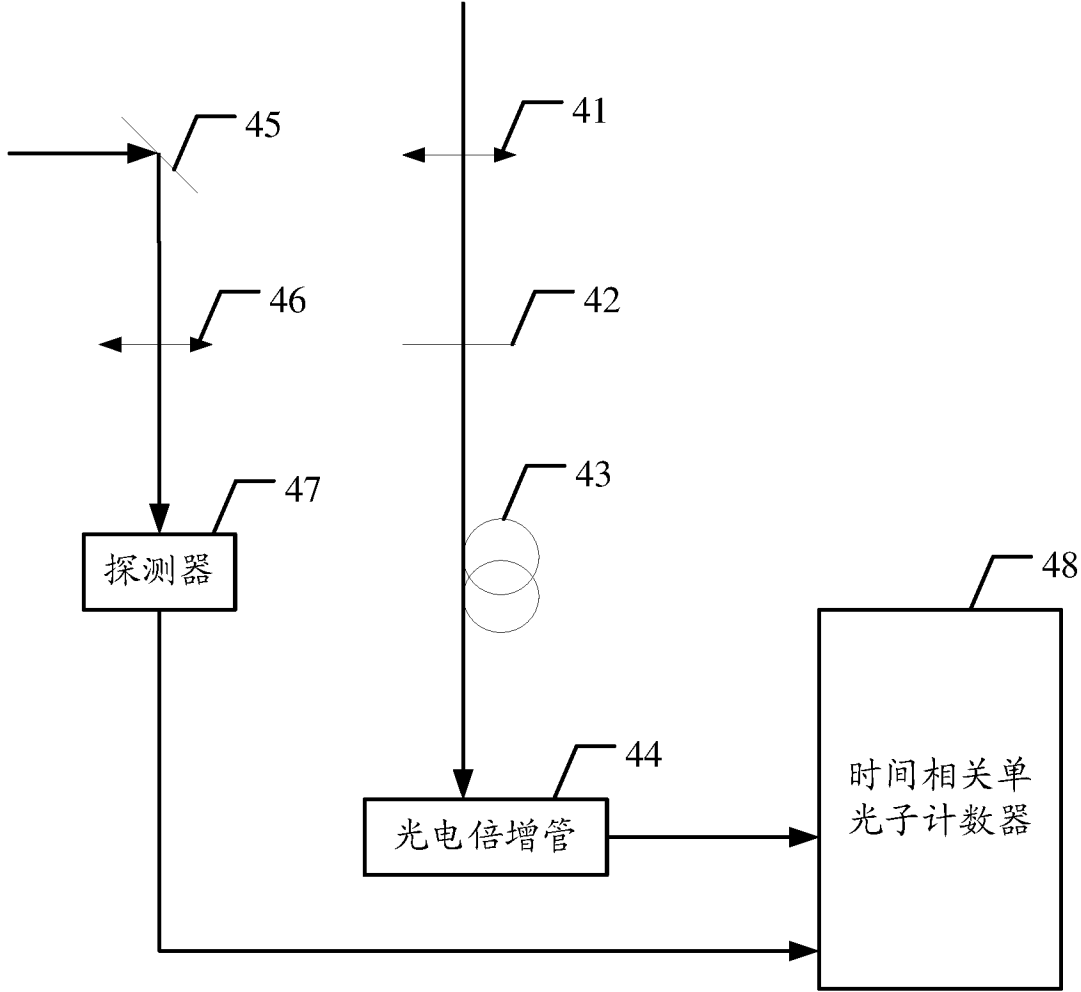


图 5

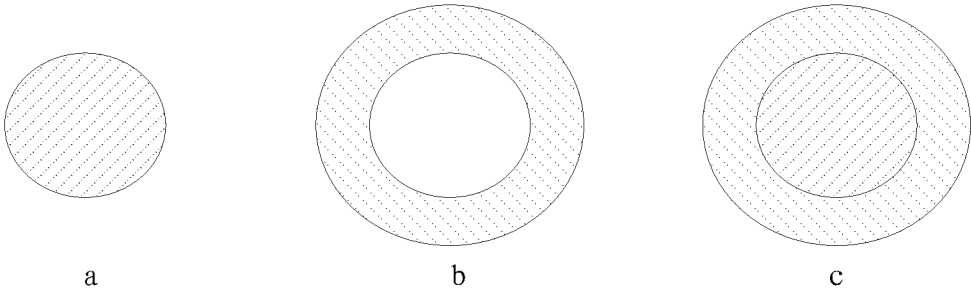


图 6

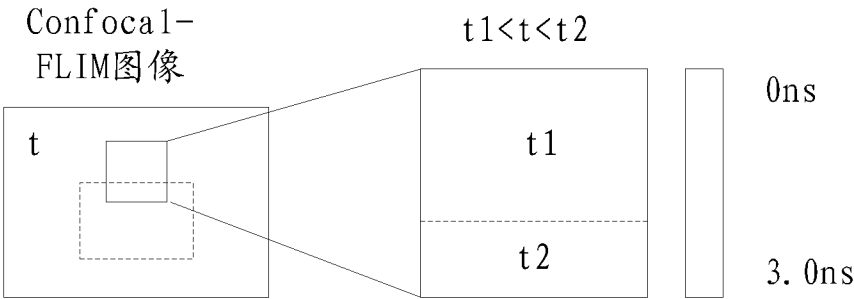


图 7

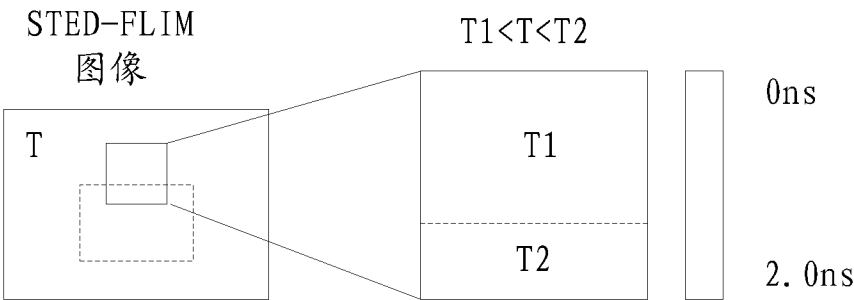


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/070468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B 21/00(2006.01)i; G01N 21/64(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, G01N

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, WPI, EPODOC: 环形, 环型, 显微, 显微镜, 损耗光, 耗尽光, 成像, 计数, 空心, circular, microscop+, imag?+, STED, deplet+, annular, count+, arithmometer, cirque

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 105241857 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 13 January 2016 (2016-01-13) description, paragraphs [0020]-[0047], and figures 1 and 2	1-10
Y	CN 103543135 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 29 January 2014 (2014-01-29) description, paragraphs [0004], [0034]-[0036] and [0053]-[0073], and figures 1-4	1-10
A	CN 104568874 A (SUZHOU INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 29 April 2015 (2015-04-29) entire document	1-10
A	CN 108120702 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 05 June 2018 (2018-06-05) entire document	1-10
A	CN 105467572 A (PEKING UNIVERSITY) 06 April 2016 (2016-04-06) entire document	1-10
A	CN 106133580 A (HAMAMATSU PHOTONICS K. K.) 16 November 2016 (2016-11-16) entire document	1-10
A	CN 106841149 A (WANG, Fu) 13 June 2017 (2017-06-13) 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

12 September 2019

Date of mailing of the international search report

30 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
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/CN2019/070468

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 202017100426 U1 (ABBERIOR INSTRUMENTS GMBH) 16 March 2017 (2017-03-16) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/070468

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105241857	A	13 January 2016	CN	105241857	B	29 December 2017
CN	103543135	A	29 January 2014	CN	103543135	B	01 June 2016
CN	104568874	A	29 April 2015	CN	104568874	B	18 July 2017
CN	108120702	A	05 June 2018	None			
CN	105467572	A	06 April 2016	CN	105467572	B	01 June 2018
CN	106133580	A	16 November 2016	US	2017031145	A1	02 February 2017
				JP	6400933	B2	03 October 2018
				JP	2015200693	A	12 November 2015
				CN	106133580	B	12 March 2019
				WO	2015151838	A1	08 October 2015
				DE	112015001640	T5	09 February 2017
				US	10168521	B2	01 January 2019
				JP	2018197881	A	13 December 2018
CN	106841149	A	13 June 2017	None			
DE	202017100426	U1	16 March 2017	WO	2018138087	A1	02 August 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/070468

A. 主题的分类 G02B 21/00(2006.01)i; G01N 21/64(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, G01N 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, WPI, EP0DOC:环形, 环型, 显微, 显微镜, 损耗光, 耗尽光, 成像, 计数, 空心, circular, microscop+, imag?+, STED, deplet+, annular, count+, arithmometer, cirque		
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
Y	CN 105241857 A (深圳大学) 2016年 1月 13日 (2016 - 01 - 13) 说明书第[0020]-[0047]段、附图1-2	1-10
Y	CN 103543135 A (浙江大学) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 说明书第[0004], [0034]-[0036], [0053]-[0073]段、附图1-4	1-10
A	CN 104568874 A (中国科学院苏州生物医学工程技术研究所) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 全文	1-10
A	CN 108120702 A (浙江大学) 2018年 6月 5日 (2018 - 06 - 05) 全文	1-10
A	CN 105467572 A (北京大学) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 全文	1-10
A	CN 106133580 A (滨松光子学株式会社) 2016年 11月 16日 (2016 - 11 - 16) 全文	1-10
A	CN 106841149 A (王富) 2017年 6月 13日 (2017 - 06 - 13) 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		国际检索报告邮寄日期
2019年 9月 12日		2019年 9月 30日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
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		李国琛 电话号码 86-(10)-53962578

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
A	DE 202017100426 U1 (ABBERIOR INSTR GMBH) 2017年 3月 16日 (2017 - 03 - 16) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/070468

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	105241857	A	2016年 1月 13日	CN 105241857 B	2017年 12月 29日
CN	103543135	A	2014年 1月 29日	CN 103543135 B	2016年 6月 1日
CN	104568874	A	2015年 4月 29日	CN 104568874 B	2017年 7月 18日
CN	108120702	A	2018年 6月 5日	无	
CN	105467572	A	2016年 4月 6日	CN 105467572 B	2018年 6月 1日
CN	106133580	A	2016年 11月 16日	US 2017031145 A1	2017年 2月 2日
				JP 6400933 B2	2018年 10月 3日
				JP 2015200693 A	2015年 11月 12日
				CN 106133580 B	2019年 3月 12日
				WO 2015151838 A1	2015年 10月 8日
				DE 112015001640 T5	2017年 2月 9日
				US 10168521 B2	2019年 1月 1日
				JP 2018197881 A	2018年 12月 13日
CN	106841149	A	2017年 6月 13日	无	
DE	202017100426	U1	2017年 3月 16日	WO 2018138087 A1	2018年 8月 2日