

(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
2015 年 6 月 25 日 (25.06.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/089910 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/001138
- (22) 国际申请日: 2014 年 12 月 17 日 (17.12.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
61/963,905 2013 年 12 月 18 日 (18.12.2013) US
201410669870.8 2014 年 11 月 20 日 (20.11.2014) CN
- (71) 申请人: 香港科技大学 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国香港九龙清水湾, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人: 雷明德 (LOY, Ming Tak, Michael); 中国香港九龙清水湾香港科技大学物理系, Hong Kong (CN)。 杜胜望 (DU, Shengwang); 中国香港九龙清水湾香港科技大学物理系, Hong Kong (CN)。 赵腾 (ZHAO, Teng); 中国香港九龙清水湾香港科技大学

物理系, Hong Kong (CN)。 王莹 (WANG, Ying); 中国香港九龙清水湾香港科技大学物理系, Hong Kong (CN)。

- (74) 代理人: 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 (INSIGHT INTELLECTUAL PROPERTY LIMITED); 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 A 座 19A, Beijing 100098 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, 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,

[见续页]

(54) Title: DEEP-CELL SUPER-RESOLUTION IMAGING METHOD AND SYSTEM AND PRISM OPTICAL SHEET APPARATUS

(54) 发明名称: 深层细胞超分辨率成像的方法、系统及棱镜光薄片装置

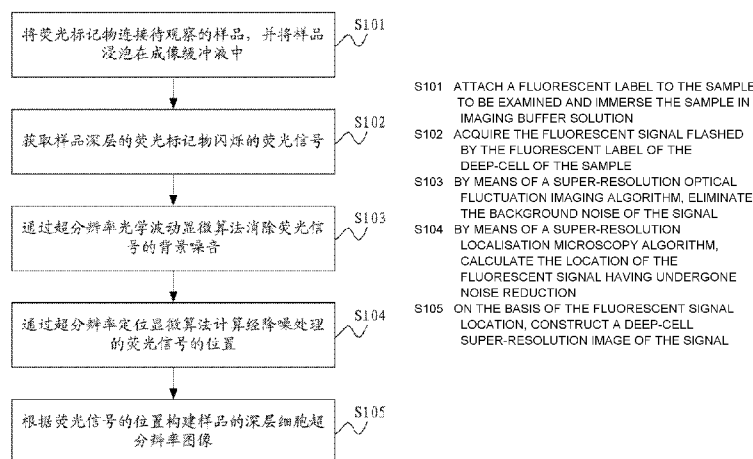


图 1 / FIG. 1

(57) Abstract: A deep-cell super-resolution imaging method and system and a prism optical sheet apparatus are provided. The imaging method uses super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) and super-resolution localisation microscopy (LM), can acquire deep-cell super-resolution imaging by using a computer to eliminate background noise, and can be directly applied to an ordinary fluorescent microscope without requiring modification to the original optical structure. The imaging system loads the prism optical sheet apparatus onto an inverted microscope and uses a physical method to reduce the background noise, obtaining deep-cell super-resolution images by means of localisation microscopy, and can be directly loaded on to a traditional inverted fluorescent microscope.

(57) 摘要: 提供了一种深层细胞超分辨率成像的方法, 系统及棱镜光薄片装置。该成像方法使用超分辨率光学波动显微技术 (SOFI) 和超分辨率定位显微技术 (LM), 能够通过计算机运算消除非关联的背景噪音来获取细胞深层的超分辨率图像, 可以直接应用于普通的荧光显微镜并且无需要修改其原有的光学结构。该成像系统将棱镜光薄片装置加载于倒置显微镜上, 通过物理手段减少背景噪音并通过定位显微技术来得到细胞深层的超分辨率图像, 可以直接加载于传统的倒置的荧光显微镜上。



WO 2015/089910 A1



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))。

深层细胞超分辨率成像的方法、系统及棱镜光薄片装置

技术领域

- 5 本发明涉及光学显微技术和生物细胞成像技术领域，尤其涉及一种深层细胞超分辨率成像的方法、系统及棱镜光薄片装置。

背景技术

- 超分辨率（Super-Resolution）定位显微术可提供近分子级别的分辨率。这一技术的发展极大地推进了人们对细胞内结构的理解。但是，在本质上这一技术依赖于对单个荧光标记分子的成像和精确定位，并且需极高的图像 SNR（Signal to Noise Ratio，信噪比）来保证定位的精度。定位显微术（Localization Microscopy, LM）通常使用全内反射（Total Internal Reflection, TIRF）或近全内反射（near-TIRF）方法，通过限制照明区域的深度来降低背景噪音，因此该方法的成像区域受限于样品载玻片表面以上几微米以内。

- 目前，对于高自发荧光或结构密集的细胞或者组织的深层成像仍然依赖于其他技术如共聚焦显微镜（Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM）。在另一方面，近期开发的超分辨率光学波动显微术（Localization Microscopy, LM）通过应用计算高阶相关度来分析每个荧光标记分子的信号波动，从而减小每个分子的点扩散函数（point spread function），并以此来提高分辨率。此技术的分辨率和高阶相关运算的阶次开方成正比，因此理论上可通过提高运算阶次来进一步增加分辨率，但是在现实中其分辨率极限为 100 纳米。另外，由于荧光标记物的信号只和自身相关，和其他层面分子所产生的背景信号并无相关性，该方法所使用的高阶相关运算可有效的消除背景噪音，从而实现光学切片成像。

- 25 目前切片成像技术在生物学研究中扮演着重要角色。扫描共聚焦显微镜（以及转盘共聚焦）作为主要的切片成像手段已经存在了 25 年。这一技术利用小孔来滤除非成像平面的背景信号。目前已有的受激辐射损耗显微技术就是基于扫描共聚焦显微镜开发而成的超分辨率显微技术。其分辨率可达 50 纳米。这一技术的局限在于所拍摄样品必须能够承受极高的激光照射因此限制了可供拍摄样品的种类。

利用光片技术从样品的侧向照明同样可实现切片成像，和共聚焦技术相比，该方法可在很大程度上减小细胞所承受的光强。另外已有文献声称结合定位显微术和光片技术实现超分辨率成像并取得40纳米的分辨率。但是目前受限于由于照明与探测的几何结构问题，这一技术仍然很难被应用于拍摄更普遍的生物样品。

综上可知，现有技术在实际使用上显然存在不便与缺陷，所以有必要加以改进。

发明内容

针对上述的缺陷，本申请的目的在于提供深层细胞超分辨率成像的方法、系统及棱镜光薄片装置，其能够在不改变现有显微镜结构的基础上，实现深层细胞超分辨率成像。

在本申请的第一方面中，提供了一种深层细胞超分辨率成像的方法。该方法可应用于超分辨率定位显微镜中，并包括：

将荧光标记物连接于待观察的样品，并将所述样品浸泡在成像缓冲液中；

获取所述荧光标记物在所述样品的深层闪烁的荧光信号；

通过超分辨率光学波动显微算法消除所述荧光信号的背景噪音；

通过超分辨率定位显微算法计算经降噪处理的所述荧光信号的位置；

根据所述荧光信号的位置构建所述样品的深层细胞超分辨率图像。

在根据本申请的一个实施方式中，所述通过超分辨率光学波动显微算法消除所述荧光信号的背景噪音的步骤包括：通过二阶或高阶相关度分析算法处理所述荧光信号，以去除所述荧光信号中非关联的所述背景噪音；而所述通过超分辨率定位显微算法计算经降噪处理的所述荧光信号的位置的步骤包括：通过高斯拟合、最大相似度或者寻找质量中心算法计算经降噪处理的所述荧光信号的中心位置。

在根据本申请的一个实施方式中，所述通过超分辨率光学波动显微算法消除所述荧光信号的背景噪音的步骤进一步包括：将所述荧光信号记录成动画；将所述动画重组为一系列的动画组，每个所述动画组包含预定个数的帧；以及通过所述超分辨率光学波动显微算法对每个所述动画组进行二阶相关度运算，

以去除所述荧光信号中非关联的所述背景噪音。

经降噪处理的动画可被组重组为新动画。在通过超分辨率定位显微算法计算经降噪处理的所述荧光信号的位置的步骤则进一步包括：对所述新动画中的每一帧进行分析，通过与预定的点扩散函数相匹配的尺寸定位图像来识别非重叠的所述荧光信号；获取每个所述非重叠的荧光信号；以及根据所述超分辨率定位显微算法定位出每个所述非重叠的荧光信号的中心位置，以此构建相应的分辨率定位显微图像。

例如，所述根据荧光信号的位置构建所述样品的深层细胞超分辨率图像的步骤还可包括：将每个所述荧光信号的中心位置叠加以构建所述样品的深层细胞超分辨率图像。

在本申请的第二方面中，提供了一种深层细胞超分辨率成像的系统。该系统应用于超分辨率定位显微镜中，并可包括：

信号获取模块，用于获取所述样品深层的荧光标记分子闪烁的荧光信号，所述样品预先与荧光标记物连接并浸泡在成像缓冲液中；

SOFI 模块，用于通过超分辨率光学波动显微算法消除所述荧光信号的背景噪音；

LM 模块，用于通过超分辨率定位显微算法计算经降噪处理的所述荧光信号的位置；

成像模块，用于根据所述荧光信号的位置构建所述样品的深层细胞超分辨率图像。

根据本申请的一些实施方式，所述 SOFI 模块用于通过二阶或高阶相关度分析算法处理所述荧光信号，以去除所述荧光信号中非关联的所述背景噪音；所述 LM 模块用于通过高斯拟合、最大相似度或者寻找质量中心算法计算经降噪处理的所述荧光信号的中心位置。

在本申请的第三方面中，提供了深层细胞超分辨率成像的方法。根据本申请一些实施方式，该方法可包括：将棱镜光薄片装置设置于倒置显微镜的顶部，通过物理手段消除非关联的背景噪音；在对样品进行定位显微时，通过超分辨率定位显微算法计算荧光标记分子的位置，并根据所述荧光标记分子的位置构

建所述样品的深层细胞超分辨率图像。

根据本申请的一些实施方式，所述将棱镜光薄片装置设置于倒置显微镜的顶部的步骤包括：将所述棱镜光薄片装置设置于所述倒置显微镜的顶部，并使得所述棱镜光薄片装置与水平方向的样品平台之间存在一预定角度。所述棱镜光薄片装置至少包括照明物镜和安装在所述照明物镜上的棱镜，其中所述棱镜使所述照明物镜的照明光改变方向，并压缩所述照明光的光束厚度。

在本申请的第四方面中，提供了一种棱镜光薄片装置，其中，所述棱镜光薄片装置设置于倒置显微镜的顶部，并包括有第一准直正透镜、负透镜、第二准直正透镜、柱面镜和照明物镜，其特征在于，所述棱镜光薄片装置还包括安装在所述照明物镜上的棱镜，用于改变照明物镜的照明光的方向，使所述照明光垂直于照明物镜并增加照明视场，并压缩所述照明光的光束厚度。

本发明的第一种技术方案结合了超分辨率光学波动显微术（Super-resolution Optical Fluctuation Microscopy, SOFI）和超分辨率定位显微术（Localization Microscopy, LM），能够通过计算机运算消除非关联的背景噪音来获取细胞深层的超分辨率图像，可以直接应用于普通的荧光显微镜并且无需修改其原有的光学结构。本发明的第二种技术方案使用棱镜光薄片装置加载于倒置显微镜上，通过物理手段减少背景噪音并通过定位显微术来得到细胞深层的超分辨率图像，可以直接加载于传统的倒置荧光显微镜。

附图说明

- 图 1 是本发明第一种深层细胞超分辨率成像的方法流程图；
- 图 2 是本发明第一种深层细胞超分辨率成像的优选方法流程图；
- 图 3 是本发明第一种深层细胞超分辨率成像的系统结构示意图；
- 图 4 是本发明第二种深层细胞超分辨率成像的方法流程图；
- 图 5 是本发明棱镜光薄片装置的结构示意图；
- 图 6a~图 6b 是本发明使用 SOFI 来消除背景的仿真结果的示意图；
- 图 7a~图 7i 是本发明 BSHSY-5Y 细胞中线粒体外膜的层析成像；
- 图 8a~图 8f 是本发明超分辨率定位显微镜对烟草 BY-2 细胞中 MVBs 成像

和用超分辨率定位显微镜与 SOFI 结合成像结果的比较示意图；

图 9a 是本发明棱镜光薄片显微镜的结构图；

图 9b 是本发明加入棱镜后光薄片的偏折角度的示意图。

图 9c 是本发明加入棱镜后光薄片的偏折角度和压缩系数的仿真结果示意

5 图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，在本文中所描述的具体实施方式仅仅用以解释本申请的一些示例，并不用于限定本发明。

本发明第一种技术方案结合了超分辨率光学波动显微术（Super-resolution Optical Fluctuation Microscopy, SOFI）和超分辨率定位显微术（Localization Microscopy, LM），能够通过计算机运算由于离焦的荧光分子产生的非相干背景，来获取细胞深层的超分辨率图像，该技术可直接应用于普通的荧光显微镜并且无需修改其原有的光学结构。

本发明第二种技术方案使用棱镜光薄片照明的方法。光薄片照明方法可从物理角度去除离焦的荧光分子信号，因此与超分辨率定位显微术结合适用于深层细胞超分辨率成像。这一照明结构同样可直接加载于传统的倒置荧光显微镜。这些方法可扩大超分辨率定位显微术的适用范围，使其从细胞表面几微米的范围扩大到细胞深层几百微米，并且获知细胞结构和蛋白的位置的能力可达到 TEM（Transmission electron microscope，透射电子显微镜）相近的范围，但与 TEM 相比更简单容易实现。

图 1 是根据本申请一个实施方式的深层细胞超分辨率成像的方法流程图，该方法应用于超分辨率定位显微镜中，并包括以下的步骤。

在步骤 S101 中，将荧光标记物连接待观察的样品，并将样品（例如细胞）浸泡在成像缓冲液中。

在一个实施方式中，使用普通免疫荧光标记方法将荧光标记物（即，荧光标记分子）连接需要观察的生物样品，再将样品浸泡在成像缓冲液中。在免疫

荧光标记方法中，可例如使用 Alexa 647 或者 Alexa 750 荧光团标记样品。成像缓冲液成分可例如包括：三（2-羧乙基）膦盐，葡萄糖氧化酶，葡萄糖，过氧化氢酶，以及环辛四烯。

在步骤 S102 中，获取样品深层（例如细胞深层）的荧光标记分子闪烁的荧光信号。因为荧光标记分子（在本文中还称为“荧光标记物”）会标记细胞中所有符合特异性的结构（如：细胞微管结构），但是处于深层的结构（同样被荧光分子标记）会表现出较强的背景。一般系统为了降低背景，通过特殊手段（如全内反射显微术）仅仅采集细胞表层结构的荧光信号。而在该方法中，为了实现细胞深层结构成像而采集细胞深层的荧光信号。荧光分子仅会在有成像缓冲液的条件发出闪烁的信号。

在步骤 S103 中，通过 SOFI 算法消除荧光信号的背景噪音。在一个实施方式中，通过二阶或高阶相关度分析算法处理荧光信号，以去除荧光信号中非关联的背景噪音。

在步骤 S104 中，通过 LM 算法计算经降噪处理的荧光信号的位置。在一个实施方式中可例如通过高斯拟合、最大相似度或者寻找质量中心算法计算经降噪处理的荧光信号的中心位置。所述荧光信号的中心位置即荧光标记分子的精确位置。

在步骤 S105 中，根据荧光信号的位置构建样品的深层细胞超分辨率图像。

图 2 是本发明第一种深层细胞超分辨率成像的优选方法流程图，所述方法应用于超分辨率定位显微镜中，包括的步骤有：

步骤 S201，将荧光标记物连接待观察的样品，并将样品浸泡在成像缓冲液中；

步骤 S202，获取样品深层的荧光标记分子闪烁的荧光信号；以及

步骤 S203，将荧光信号记录成动画。

步骤 S204，将动画重组为一系列的动画组，每个动画组包含预定个数的帧；
步骤 S205，通过 SOFI 算法对每个动画组进行二阶相关度运算，以去除荧光信号中非关联的背景噪音。

根据本申请的一个实施方式，上述方法可选地还可包括：步骤 S206，将经

降噪处理的动画组重组为新动画。这样，在步骤 S207 中，对新动画中的每一帧进行分析，通过与预定的点扩散函数相匹配的尺寸定位图像来识别非重叠的荧光信号，接着在步骤 S208，获取每个所述非重叠的荧光信号，而在步骤 S209 中，根据所述超分辨率定位显微算法定位出每个所述非重叠的荧光信号的中心位置，最后在步骤 S210 中根据定位出的中心位置构建相应的分辨率定位显微图像。

这是一种基于软件的方法，不需对于现有的 LM 镜有其他硬件方面的改动。

10 图 3 是根据本申请一些实施方式（第一种技术）的深层细胞超分辨率成像的系统结构示意图，所述系统 100 应用于超分辨率定位显微镜中，并包括有信号获取模块 10、SOFI 模块 20 和 LM 模块 30。

信号获取模块 10 用于获取样品深层的荧光标记分子闪烁的荧光信号，样品预先与荧光标记物连接并浸泡在成像缓冲液中。在一个实施方式中，使用普通免疫荧光标记方法将荧光标记物连接需要观察的生物样品，再将样品浸泡在成像缓冲液中，所述免疫荧光标记方法优选使用 Alexa 647 或者 Alexa 750 荧光团标记样品；所述成像缓冲液成分优选包括：三（2-羧乙基）磷盐，葡萄糖氧化酶，葡萄糖，过氧化氢酶，以及环辛四烯。

20 SOFI 模块 20 用于通过 SOFI 算法消除荧光信号的背景噪音。在本申请的一个实施方式中，所述 SOFI 模块 20 用于通过二阶或高阶相关度分析算法处理荧光信号，以去除荧光信号中非关联的背景噪音。

LM 模块 30 用于通过 LM 算法计算经降噪处理的荧光信号的位置。在本申请的一个实施方式中，所述 LM 模块 30 用于通过高斯拟合、最大相似度或者寻找质量中心算法计算经降噪处理的荧光信号的中心位置。所述荧光信号的中心位置即荧光标记分子的精确位置。

如图所示，系统 100 还可包括用于根据荧光信号的位置构建样品的深层细胞超分辨率图像的成像模块 40。

30 在本申请的一个实施方式中，所述 SOFI 模块 20 进一步包括：

记录子模块 21, 用于将荧光信号记录成动画;

第一重组子模块 22, 用于将动画重组为一系列的动画组, 每个动画组包含预定个数的帧;

5 运算子模块 23, 用于通过 SOFI 算法对每个动画组进行二阶相关度运算, 以去除荧光信号中非关联的背景噪音; 以及

第二重组子模块 24, 用于将经降噪处理的动画组重组为新动画。

根据本申请的一个实施方式的 LM 模块 30 可进一步包括识别子模块 31、定位子模块 32 和第一构建子模块 33。识别子模块 31 用于对新动画中的每一帧进行分析, 通过与预定的点扩散函数相匹配的尺寸定位图像来识别非重叠的荧光信号。定位子模块 32 用于获得每个所述非重叠的荧光信号, 并根据所述超分辨率定位显微算法定位出每个所述荧光信号的中心位置。所述荧光信号的中心位置即荧光标记分子的精确位置。第一构建子模块 33 根据定位出的中心位置构建相应的分辨率定位显微图像

15

成像模块 40 则将每个荧光信号的中心位置叠加以构建样品的深层细胞超分辨率图像。

图 4 是根据本申请另一实施方式的(上述第二种技术)深层细胞超分辨率成像的方法流程图, 包括步骤有:

20

步骤 S401, 将棱镜光薄片装置设置于任何现有的倒置显微镜的顶部, 通过物理手段消除非关联的背景噪音; 以及

步骤 S402, 在对样品进行定位显微时, 通过 LM 算法计算荧光标记分子的位置, 并根据所述荧光标记分子的位置构建所述样品的深层细胞超分辨率图像。

25

如图 5 所示, 所述棱镜光薄片装置包括: 第一准直正透镜 101; 负透镜 102; 第二准直正透镜 103; 柱面镜 104; 照明物镜 105。其特征在于, 所述棱镜光薄片装置还包括安装在照明物镜 105 上的棱镜 106, 用于改变照明物镜的照明光的方向, 使照明光垂直于照明物镜并增加照明视场, 并压缩照明光的光束厚度。

30 所述棱镜光薄片装置可与水平方向的样品平台之间存在预定角度。方向改变的

角度和压缩程度都可通过调整棱镜 106 的方向来调节。

实例一：SOFI+LM：在实施定位显微时，首先用较强的激发光使样品上的荧光标记分子开始闪烁，并且用具有电子倍增功能的 CCD (Charge Coupled Device) 相机记录将这些闪烁的信号记录成动画。然后定位软件通过以下步骤对动画的每一帧进行分析：（1）通过用与期望的点扩散函数相容的尺寸定位图像来识别非重叠的闪烁分子，根据系统的点扩散函数识别单分子的荧光信号；（2）使用高斯拟合或其他方法获得每个闪烁的荧光标记分子的峰位置，从中构建 LM 图像，对识别出的荧光信号进行高斯拟合并找到信号的中心从而定位出每一个
5 荧光标记分子的精确位置。将这些位置叠加便可得到最终重构出的超分辨率图像。但是，当进行细胞深层成像时，来自其他层面的荧光信号（背景噪音）的强度会等于或大所探测层面的单分子荧光，从而改变焦平面单荧光分子图像的形状，导致算法在步骤（1）时无法找到需定位的区域，致使最终重构出的图像稀疏而不连续。

为了解决这一问题，将记录有闪烁荧光信号的动画重组为一系列的组，每个组包含 5 到 15 帧（帧数由信号强度和闪烁速度决定），然后用 SOFI 对每个组进行二阶相关运算。这一运算可有效的去除或减少随机且不相关的背景信号。然后所有经过处理的图像重组为新的动画，并送入定位程序进行分析。原则上在 LM 处理的步骤（1）中可识别更多闪烁的荧光信号，并且将在步骤（2）中
15 进一步被定位到纳米级精度，从而得到细胞深层超分辨率的切片图像而无需特殊的光学设置。这种方法基本上被应用于 SOFI 以在 LM 算法前去除背景，将该方法称为 SOFI+STORM。

首先，将通过数值模拟证实 SOFI 的背景去除能力。在 Matlab 程序（美国 MathWorks 公司出品的商业数学软件）中，首先在焦平面生成 20 个随机闪烁的
25 发光点，然后在离焦区域（1.5 微米至 4 微米范围）随机生成 30000 个点光源。每个发光点的平均发光时间为 2 帧，一共生成 10 帧。这一模拟很好的重现了使用明场荧光显微时的环境。第一步，直接用定位程序处理这 10 帧图像。第二步，先使用 SOFI 对图像进行降噪再使用定位软件进行处理。结果显示，对于未经 SOFI 处理的图像，如图 6a，离焦信号严重干扰了定位程序，因此每帧最多只有一个位置可被检测出。作为对比，通过 SOFI 进行降噪处理，程序可识别并定位
30

更多的位置，如图 6b。而且 SOFI+LM 能在对厚样品的超分辨率成像中提供更高的效率。

在实验中，对两种样品进行了测试：（1）SHSY-5Y（人神经母细胞瘤）细胞系中的线粒体外膜和（2）烟草根 BY-2 细胞中的多泡体。两种样品都用 Alexa-647 进行荧光标记，并浸泡于标准的定位显微缓冲液中。首先使用共聚焦显微镜对某一区域进行拍照用来和 SOFI+LM 方法进行对比。对于线粒体样品，扫描层面为样品表面向上 12 微米，10 微米和 8 微米处。对于多泡体样品，扫描层面为细胞表面内 15 微米深。所有的共聚焦显微图片由蔡司 LSM7 DUO 显微镜拍摄。然后，用自制的定位显微镜对以上区域层面进行拍摄。自制显微镜建
10 于一个配有大数值孔径镜头倒置的荧光明场显微镜（优选尼康 Ti-E），所述大数值孔径镜头优选包括 60 倍 CFI Plan Flour（平场荧光物镜）以及 100 倍 CFI APO TIRF（尼康物镜）。所配滤镜组为：荧光滤镜：Semrock FF01-440/521/607/700-25，分束镜：Semrock FF410/504/582/669-25-36。所使用相机为：Andor ixon3 EMCCD。激光照明由一台 656 纳米固体激光器提供（照明
15 强度为 0.5-0.8 千瓦每平方厘米）以及一台 405 纳米半导体激光器（照明强度为 8 瓦每平方厘米）。激光强度为恰好时每个染料分子的发光时间为大约两帧。对于样品（1），使用 100 倍镜头并以 20 赫兹的频率进行记录，一共记录 30000 帧。对于样品（2），实验使用 60 倍镜头从而使焦平面达到 15 微米的深度。同样用 30 赫兹的频率记录 40000 帧。实验所使用的 SOFI 以及定位算法来自于
20 localizer（一种开源程序）。

图 7a~7i 对比了共聚焦显微镜（Confocal），SOFI+LM 以及单独使用 LM 所得的不同层面线粒体外膜图像。这些图像清楚的展示了 SOFI+LM 的分层能力以及对分辨率的提高。相较于共聚焦显微镜和 LM，在 12 微米（um）深的层面，SOFI+LM 明显的展示了其成像质量的优势。即便是在背景较弱的 8 微米深的层
25 面，SOFI+LM 依旧胜过了 LM。在更潜的层面，LM 由于使用了全内反射来去除背景，其成像质量终于胜过了 SOFI+LM。

为了进一步展示 SOFI+LM 的性能，用其成像在烟草 BY-2 型细胞内 15 微米的深处的多泡体。由于这一结构具有较大尺寸和较强的自发荧光，人们很难使用定位显微对其成像。图 8 a 和 8 b 展示了共聚焦显微镜（Confocal）生成的
30 多泡体结构的共聚焦图像。由于横向和纵向分辨率的限制，从其中并不能看出

细小的结构。图 8e 展示了单独使用 LM 所得到的图像。正如数值模拟中的情形，由于背景的缘故，这一方法的探测效率被大大限制，从而不能重建出任何有意义的图像。与之形成对比的是，当使用 SOFI+LM 对同样的原始数据进行处理，如图 8f 所示，所最终重建出的图像质量有了本质的提高，并且可清晰的看到多
5 泡体横截面的环状结构。更为重要的是，对比于免疫金标记的电子显微镜图像，SOFI+LM 所提供的图像与之一致，且更连续稳定的体现了标记物所处的位置。如图 8c 所示，由金颗粒所标记的多泡体表面（图中黑点）和 SOFI+LM 的图像完全一致。图 8c 表明 SOFI+LM 的分辨率已达 40 纳米。总而言之，SOFI+LM 这一方法已经将定位显微术的使用范围从细胞表面几微米扩展到几十微米的区
10 域。这一手段可用更简单的器材取得近似电子显微镜的分辨率来解析细胞内结构和蛋白分布，无需复杂的样品制备手段，并且有着实施活体成像的可能性。

实例二：棱镜光薄片显微镜：本专利的第二部分为一种产生光薄片照明的新型方法，这种方法可简单的配置在任何倒置显微镜上。如图 9a 所示，通过在照明物镜之前加入一个棱镜，不仅可改变照明光的方向，使其垂直于探测物镜
15 并提供一个大的照明视场，并且可进一步使光片的厚度下降。而且，与 LSBM 相比，本发明的方法可与商用显微镜更好的结合在一起，所以应用起来更加简单，成像分辨率可通过使用一个大数值孔径的油浸物镜来得到进一步的提高。图 9b 是本发明加入棱镜后光薄片的偏折角度。图 9c 为理论计算的结果，其中压缩率为光路中没有棱镜时光薄片的厚度与有棱镜时厚度之比，在入射角度为
20 70 度时，压缩率为 2 倍。通过进一步的提高入射角度数并且调整棱镜的位置，可引入一个非常薄的光薄片照明，理论上可达到一微米以下，照明的方向平行于显微镜平台，所以可用现有的检测物镜来观测样品。这种结构在对较厚的样品进行单分子超分辨率成像中非常有用。在倒置显微镜中加入这种装置，并使用垂直方向移动的压电陶瓷，可较容易的实现深层细胞光学层析。将棱镜光薄
25 片照明系统与奥林巴斯倒置显微镜结合的系统，可利用光纤引入照明光，需要注意的是这种棱镜的结构可使光薄片非常靠近样品。

当然，本发明还可有其它多种实施例。本领域技术人员在不背离本发明精神及公开内容教导的情况下，可对上述的实施方式作出各种改变和变形，但这些改变和变形都应属于本发明所附的权利要求的保护范围。

1、一种深层细胞超分辨率成像的方法，应用于超分辨率定位显微镜中，其中，所述方法包括：

将荧光标记物连接于待观察的样品，并将所述样品浸泡在成像缓冲液中；

获取所述荧光标记物在所述样品的深层闪烁的荧光信号；

5 通过超分辨率光学波动显微算法消除所述荧光信号的背景噪音；

通过超分辨率定位显微算法计算经降噪处理的所述荧光信号的位置；以及
根据所述荧光信号的位置构建所述样品的深层细胞的超分辨率图像。

2、根据权利要求1所述的方法，其中，所述通过超分辨率光学波动显微算
10 法消除所述荧光信号的背景噪音的步骤包括：通过二阶或高阶相关度分析算法
处理所述荧光信号，以去除所述荧光信号中非关联的所述背景噪音；

所述通过超分辨率定位显微算法计算经降噪处理的所述荧光信号的位置的
步骤包括：通过高斯拟合、最大相似度或者寻找质量中心算法计算经降噪处理
的所述荧光信号的中心位置。

15

3、根据权利要求1或2所述的方法，其中，

所述通过超分辨率光学波动显微算法消除所述荧光信号的背景噪音的步骤
进一步包括：

将所述荧光信号记录成动画；

20 将所述动画重组为一系列的动画组，每个所述动画组包含预定
个数的帧；以及

通过所述超分辨率光学波动显微算法对每个所述动画组进行
二阶相关度运算，以去除所述荧光信号中非关联的所述背景噪音。

25 4、根据权利要求3所述的方法，其中，经降噪处理的所述动画组重组为新
动画，以及计算经降噪处理的所述荧光信号的位置的步骤进一步包括：

通过与预定的点扩散函数相匹配的尺寸对所述新动画中的每
一帧中的图像进行定位，来识别所述荧光信号中非重叠的荧光信
号；

30 获取每个所述非重叠的荧光信号；以及

根据所述超分辨率定位显微算法定位出每个所述非重叠的荧光信号的中心位置，以此构建相应的分辨率定位显微图像。

5 5、根据权利要求4所述的方法，其中，所述构建相应的分辨率定位显微图像的步骤包括：

将每个所述非重叠的荧光信号的中心位置叠加以构建所述样品的深层细胞的相应的分辨率定位显微图像。

10 6、一种深层细胞超分辨率成像的系统，应用于超分辨率定位显微镜中，其中，所述系统包括：

信号获取模块，用于获取样品的深层的荧光标记分子闪烁的荧光信号，所述样品预先与荧光标记分子连接并浸泡在成像缓冲液中；

SOFI 模块，用于通过超分辨率光学波动显微算法消除所述荧光信号的背景噪音；

15 LM 模块，用于通过超分辨率定位显微算法计算经降噪处理的所述荧光信号的位置；以及

成像模块，用于根据所述荧光信号的位置构建所述样品的深层细胞超分辨率图像。

20 7、根据权利要求5所述的系统，其中，所述 SOFI 模块用于通过二阶或高阶相关度分析算法处理所述荧光信号，以去除所述荧光信号中非关联的所述背景噪音；以及

所述 LM 模块用于通过高斯拟合、最大相似度或者寻找质量中心算法计算经降噪处理的所述荧光信号的中心位置。

25

8、根据权利要求4或5所述的系统，其中，所述 SOFI 模块进一步包括：记录子模块，用于将所述荧光信号记录成动画；

第一重组子模块，用于将所述动画重组为一系列的动画组，每个所述动画组包含预定个数的帧；以及

30 运算符模块，用于通过所述超分辨率光学波动显微算法对每个所述动画组

进行二阶相关度运算，以去除所述荧光信号中非关联的所述背景噪音。

9. 根据权利要求 8 所述的系统，其中，所述 SOFI 模块进一步包括：第二重组子模块，用于将经降噪处理的所述动画组重组为新动画；

5 所述 LM 模块进一步包括：

识别子模块，用于对所述新动画中的每一帧进行分析，通过与预定的点扩散函数相匹配的尺寸定位所述每一帧的图像来识别所述荧光信号中的非重叠的荧光信号；

定位子模块，用于获得每个所述非重叠的荧光信号，并根据所述超分辨率
10 定位显微算法定位出每个所述荧光信号的中心位置。所述荧光信号的中心位置即荧光标记分子的精确位置；以及

第一构建子模块，根据定位出的中心位置构建相应的分辨率定位显微图像。

10. 根据权利要求 9 所述的系统，其中，所述成像模块用于将每个所述荧光
15 信号的中心位置叠加以构建所述样品的深层细胞的所述相应的分辨率定位显微图像。

11、一种深层细胞超分辨率成像的方法，包括：

将棱镜光薄片装置设置于倒置显微镜的顶部，以通过物理手段消除非关联
20 的背景噪音；

在对样品进行定位显微时，通过超分辨率定位显微算法计算所述样品中的
荧光标记分子的位置；以及

根据所述荧光标记分子的位置构建所述样品的深层细胞超分辨率图像。

25 12、根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述将棱镜光薄片装置设置于倒置显微镜的顶部的步骤包括：

将所述棱镜光薄片装置设置于所述倒置显微镜的顶部，并使得所述棱镜光薄片装置与水平方向的样品平台之间存在预定角度。

30 13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述棱镜光薄片装置至少包括照

明物镜和安装在所述照明物镜上的棱镜，其中所述棱镜使所述照明物镜的照明光改变方向，并压缩所述照明光的光束厚度。

- 14、一种棱镜光薄片装置，其中，所述棱镜光薄片装置设置于倒置显微镜
5 的顶部，并包括有第一准直正透镜、负透镜、第二准直正透镜、柱面镜和照明物镜，其特征在于，所述棱镜光薄片装置还包括安装在所述照明物镜上的棱镜，用于改变照明物镜的照明光的方向，使所述照明光垂直于照明物镜并增加照明视场，并压缩所述照明光的光束厚度。

1/7

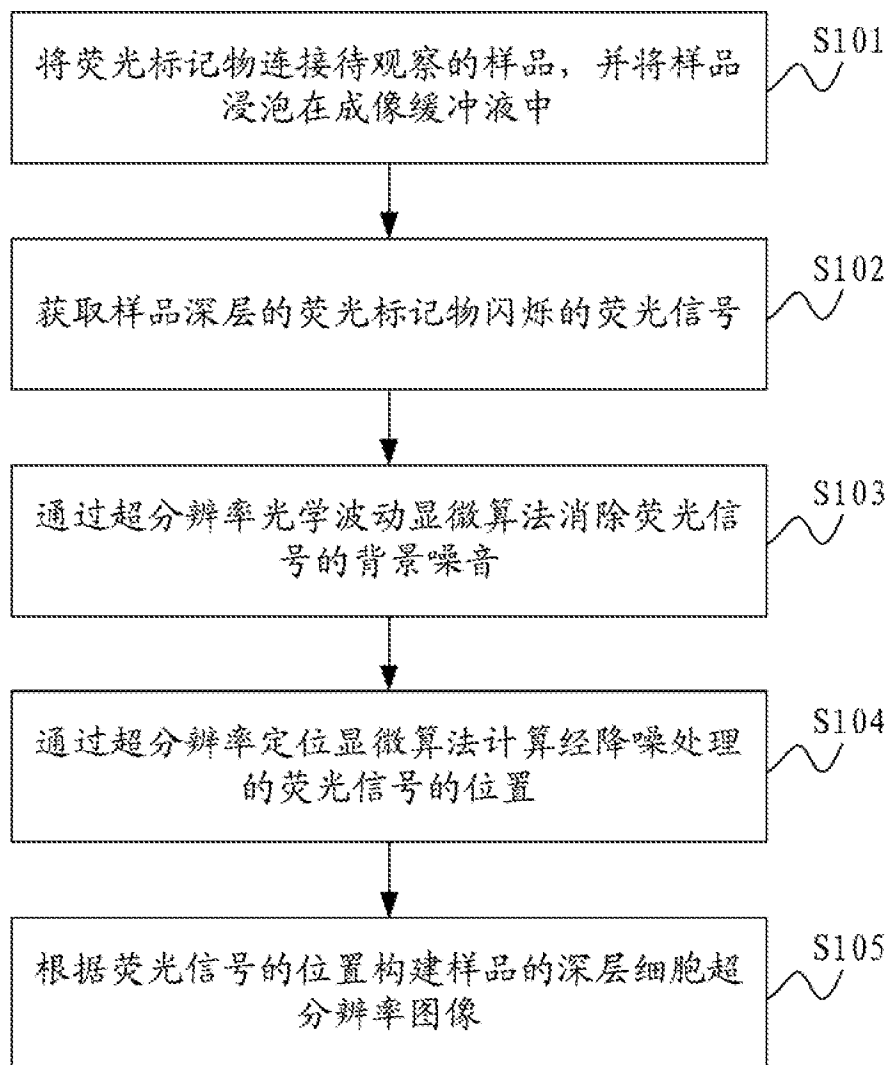


图 1

2/7

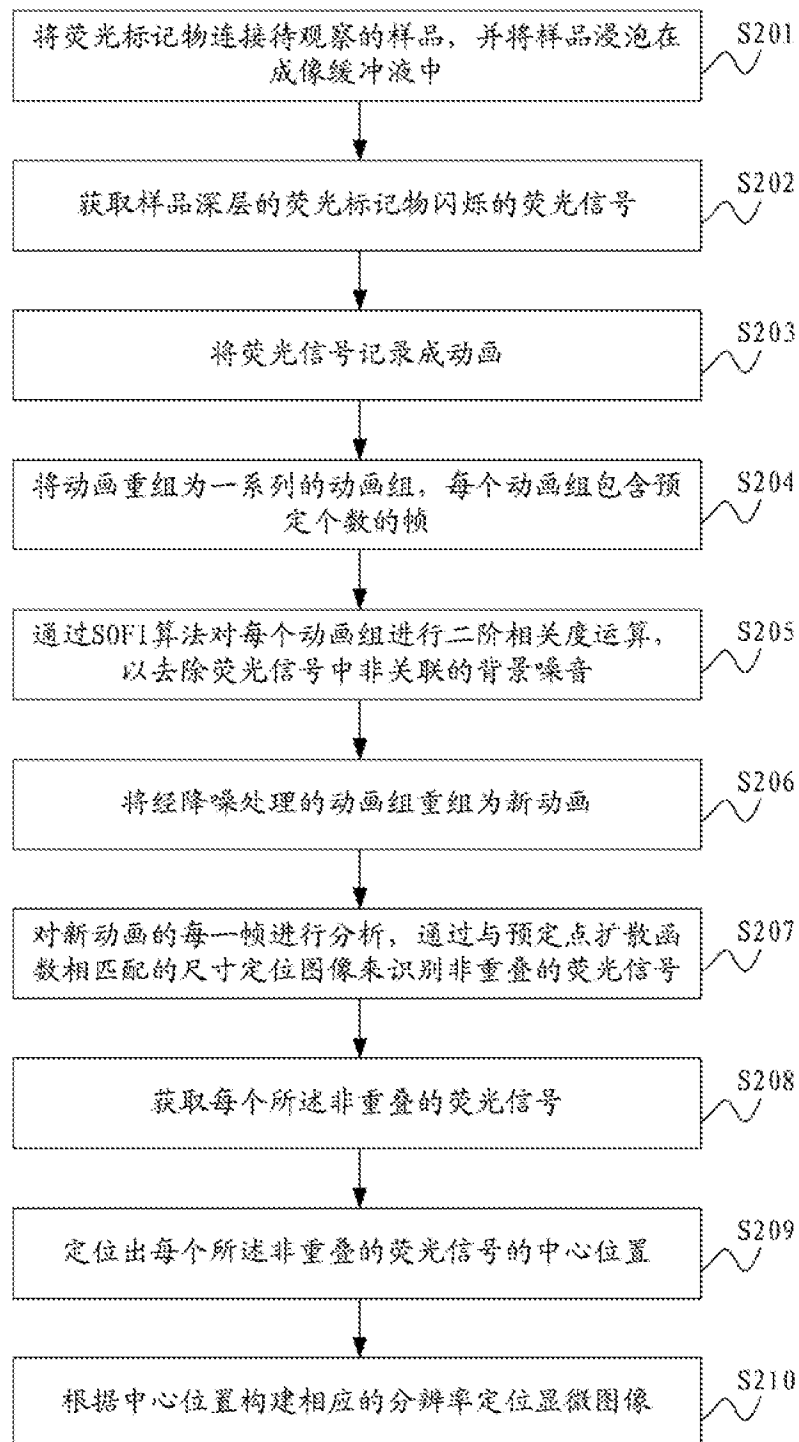


图 2

3/7

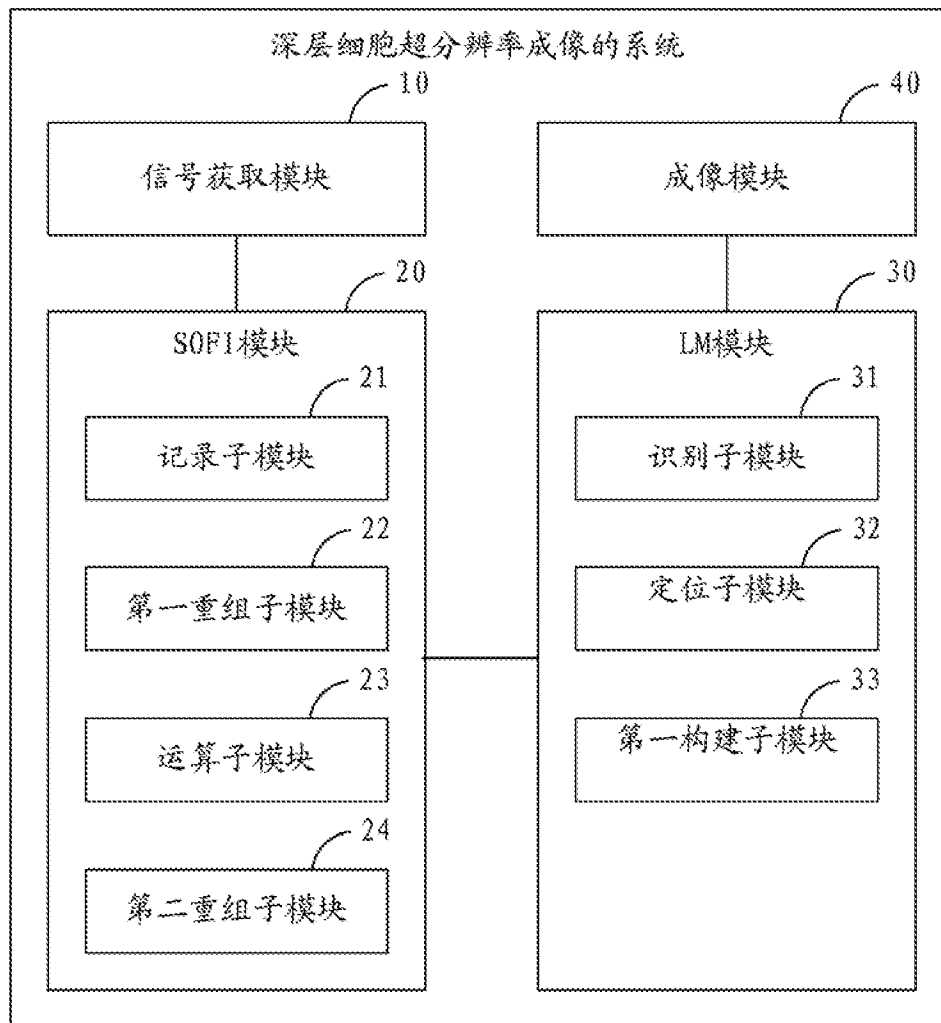


图 3

4/7

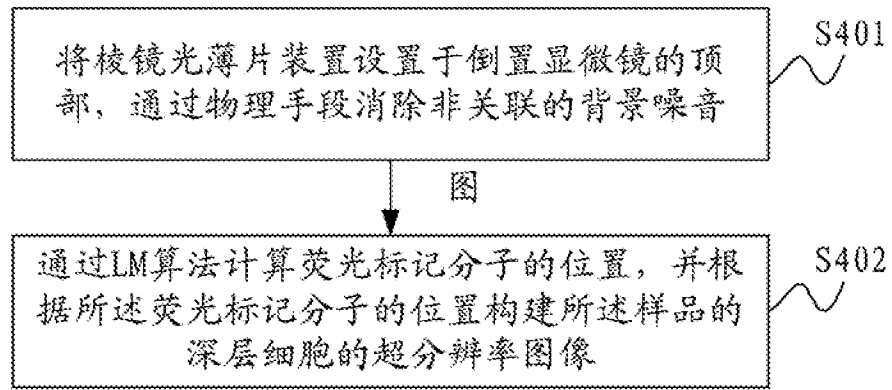


图 4

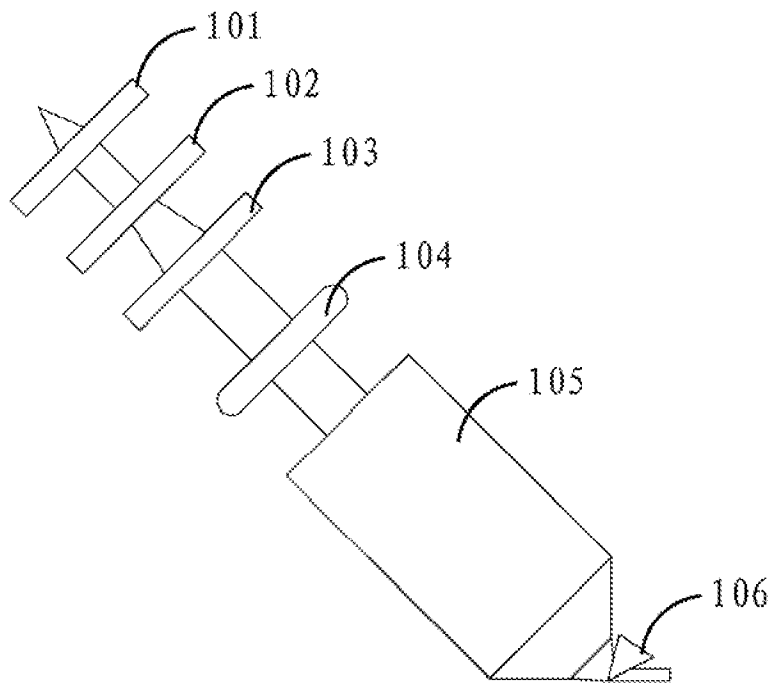


图 5

5/7

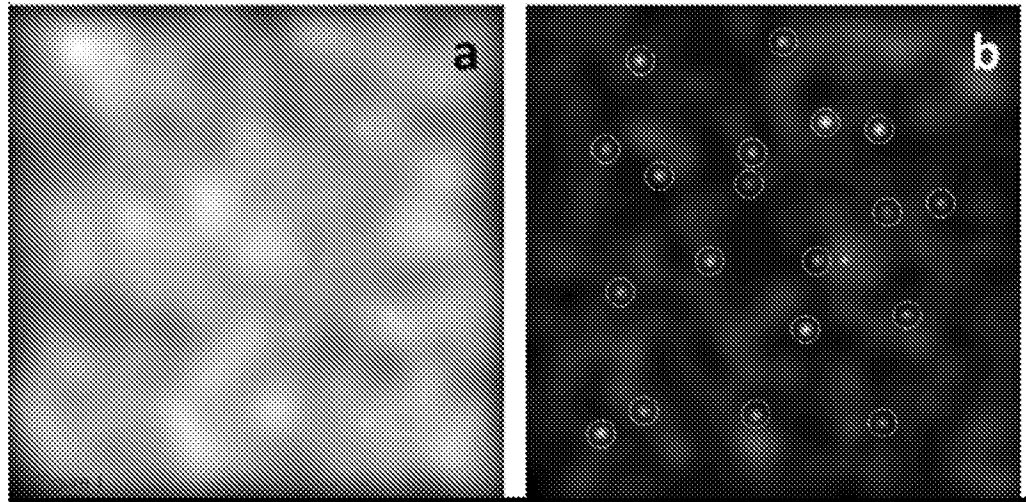


图 6a

图 6b

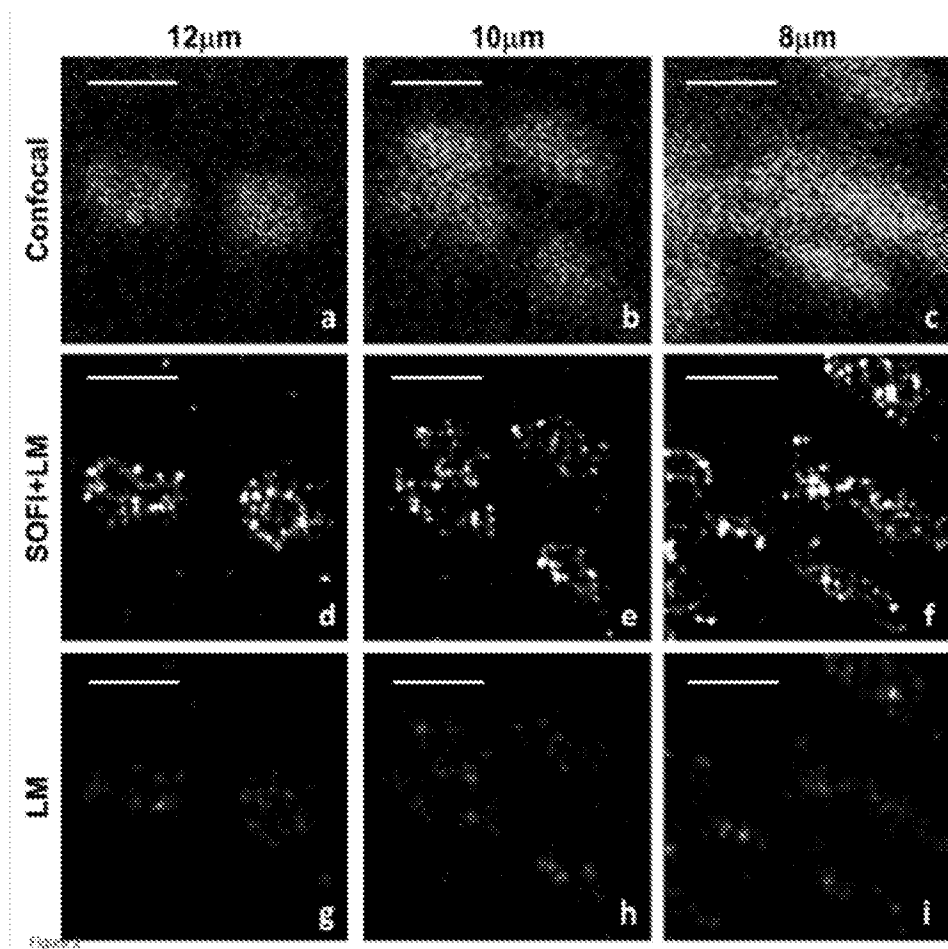


图 7a~图 7i

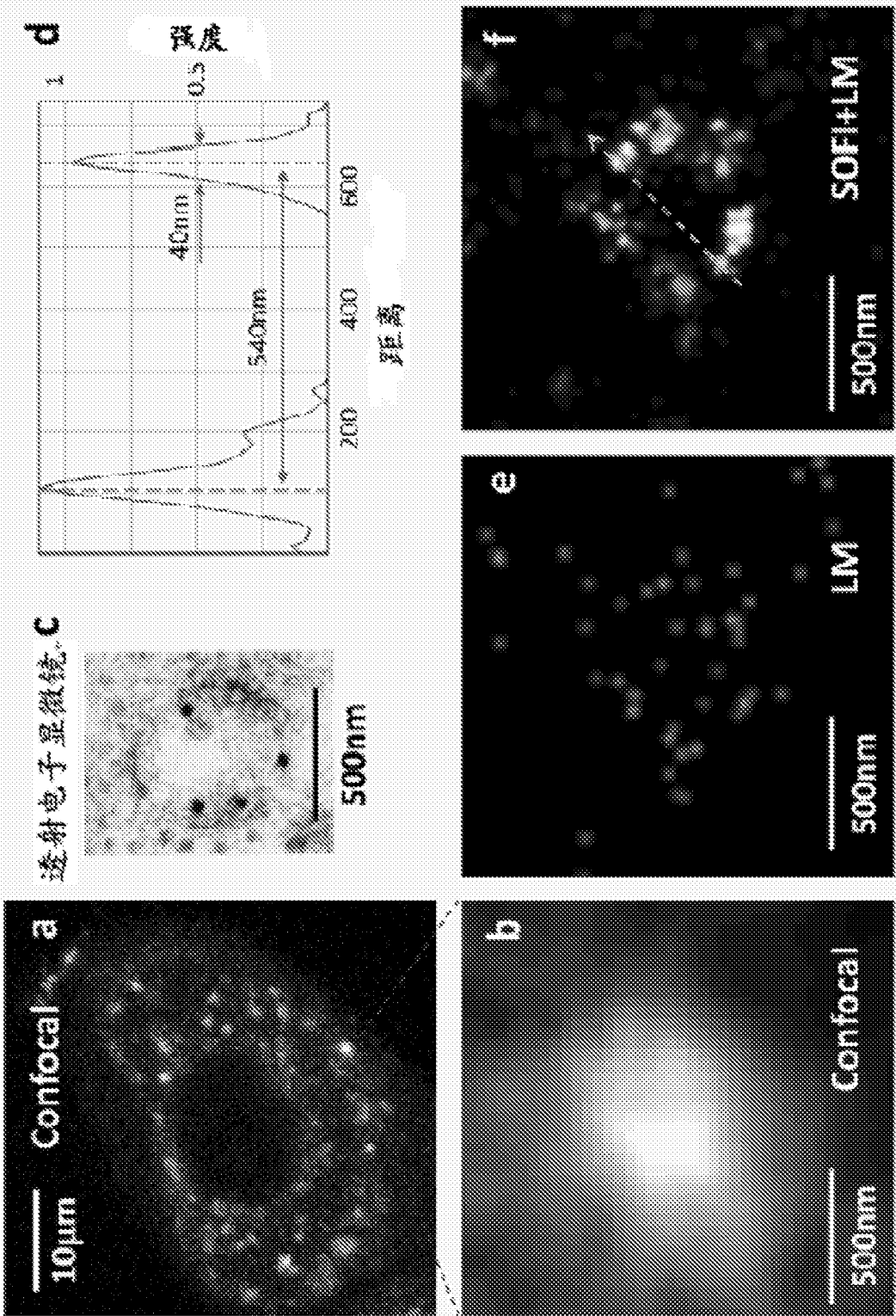


图 8a~图 8f

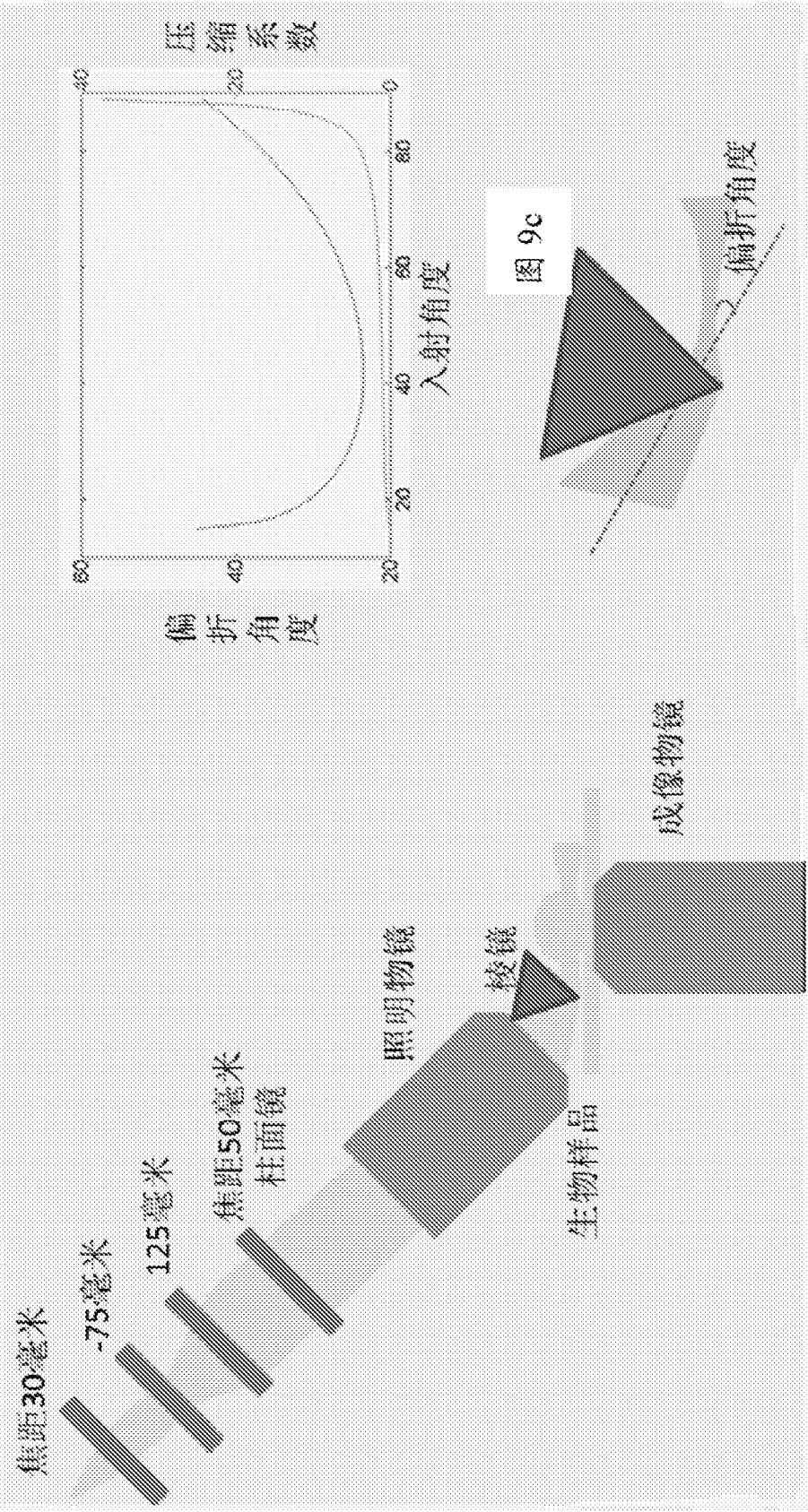


图 9b

图 9a

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/001138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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)

G01N21; G02B21

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)

CATXT; USTXT; GBXT; EPTXT; CNTXT; CNABS; WOTXT; SGTXT; CNKI; VEN; ISI Web of Knowledge: degree of correlation,
Gaussian fitting, fluorescence, prism, super resolution, imag+, microscopy, SOFI, LM, localiz+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dertinger et al. "Fast, background free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging(SOFI)" 《Proc. Natl. Acad. Sci.》, volume 106, number 52, 31 December 2009 (31.12.2009) pages 1-4	1-5
Y	Dedecker P et al. "Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for superresolution microscopy" 《Journal of biomedical optics》, volume 12, number 17, 3 December 2012 (03.12.2012), pages 126008-1—126008-2, and figure 3	1-5
X	Dedecker P et al. "Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for	6-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 10 March 2015	Date of mailing of the international search report 24 March 2015
Name and mailing address of the ISA 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 WANG, Hailing Telephone No. (86-10) 62084032

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/001138

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Superresolution microscopy”, 《Journal fo biomedical optics》, volume 12, number 17, 3 December 2012 (03.12.2012), pages 126008-1—126008-2, and figure 3 Ying S Hu, et al. “light-sheet Bayesian microscopy enables deep-cell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells” 《optical nanoscopy》, volume 1, number 2, 20 November 2013 (20.11.2013), pages 1-5, and figure 1	11-14
A	CN 200982860 Y(HARBIN AVIATION IND GROUP CO LTD) 28 November 2007 (28.11.2007) the whole document	1-14
A	US 2009242798 A1 (JACKSON LAB et al.) 1 October 2009(01.10.2009) the whole document	1-14
A	US 2011249866 A1 (UNIV COLORADO) 13 October 2011 (13.10.2011) the whole document	1-14
A	CN 101655460 A (UNIV SHANXI) 24 February 2010 (24.02.2010) the whole document	1-14
A	CN 103308496 A (XU Tao, LUO Zhiyong, JI Wei) 18 September 2013 (18.09.2013) the whole document	1-14
A	US 2009242801 A1(DEUTSCHES KREBSFORSCH et al.) 1 October 2009(01.10.2009) the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/001138

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 200982860 Y	28 November 2007	None	
US 2009242798 A1	01 October 2009	EP 2265932 B1	22 May 2013
		US 7772569 B2	10 August 2010
		EP 2265932 A1	29 December 2010
		US 2011025831 A1	03 February 2011
		US 7880149 B2	01 February 2011
		US 2010265318 A1	21 October 2010
		EP 2631632 A1	28 August 2013
		EP 2265932 A4	07 December 2011
		EP 2631633 A1	28 August 2013
		WO 2009146016 A1	03 December 2009
US 2011249866 A1	13 October 2011	US 2014015935 A1	16 January 2014
		US 8620065 B2	31 December 2013
CN 101655460 A1	24 February 2010	CN 101655460 B	22 June 2011
CN 103308496 A	18 September 2013	None	
US 2009242801 A1	01 October 2009	EP 2107363 B1	11 July 2012
		US 7897937 B2	01 March 2011
		EP 2107363 A1	07 October 2009

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/001138

A. 主题的分类

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)

G01N21;G02B21

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))

CATXT;USTXT;GBTXT;EPTXT;CNTXT;CNABS;WOTXT;SGTXT;CNABS,CNKI,VEN;ISI Web of Knowledge:超分辨率, 定位, 相关度, 高斯拟合, 显微, 荧光, 棱镜, 相似度, super resolution, imagt, microscopy, SOFI, LM, localiz+

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	Dertinger et al. "Fast , background free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)" 《Proc. Natl. Acad. Sci. 》, 第106期卷, 第52卷期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第1-4页	1-5
Y	Dedecker P et al. "Localizer: fast, accurate , open-source, and modular software package for superresolution microscopy" 《Journal of biomedical optics》, 第12期卷, 第17卷期, 2012年 12月 3日 (2012 - 12 - 03), 第126008-1--126008-2页, 图3	1-5
X	Dedecker P et al. "Localizer: fast, accurate , open-source, and modular software package for superresolution microscopy" 《Journal of biomedical optics》, 第12卷, 第17期, 2012年 12月 3日 (2012 - 12 - 03), 第126008-1--126008-2页, 图3	6-10

☒ 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

2015年 3月 10日

国际检索报告邮寄日期

2015年 3月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王海玲

电话号码 (86-10)62084032

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
X	Ying S Hu, et al. "Light-sheet Bayesian microscopy enables deep-cell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells" 《optical nanoscopy》, 第第1期卷, 第第2卷期, 2013年 11月 20日 (2013 - 11 - 20), 第1-5页, 图1	11-14
A	CN 200982860 Y (哈尔滨航空工业集团有限公司) 2007年 11月 28日 (2007 - 11 - 28) 全文	1-14
A	US 2009242798 A1 (JACKSON LAB等) 2009年 10月 1日 (2009 - 10 - 01) 全文	1-14
A	US 2011249866 A1 (UNIV COLORADO) 2011年 10月 13日 (2011 - 10 - 13) 全文	1-14
A	CN 101655460 A (山西大学) 2010年 2月 24日 (2010 - 02 - 24) 全文	1-14
A	CN 103308496 A (徐涛 罗志勇 纪伟) 2013年 9月 18日 (2013 - 09 - 18) 全文	1-14
A	US 2009242801 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH等) 2009年 10月 1日 (2009 - 10 - 01) 全文	1-5

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/001138

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	200982860	Y	2007年 11月 28日	无			
US	2009242798	A1	2009年 10月 1日	EP	2265932	B1	2013年 5月 22日
				US	7772569	B2	2010年 8月 10日
				EP	2265932	A1	2010年 12月 29日
				US	2011025831	A1	2011年 2月 3日
				US	7880149	B2	2011年 2月 1日
				US	2010265318	A1	2010年 10月 21日
				EP	2631632	A1	2013年 8月 28日
				EP	2265932	A4	2011年 12月 7日
				EP	2631633	A1	2013年 8月 28日
				WO	2009146016	A1	2009年 12月 3日
US	2011249866	A1	2011年 10月 13日	US	2014015935	A1	2014年 1月 16日
				US	8620065	B2	2013年 12月 31日
CN	101655460	A	2010年 2月 24日	CN	101655460	B	2011年 6月 22日
CN	103308496	A	2013年 9月 18日	无			
US	2009242801	A1	2009年 10月 1日	EP	2107363	B1	2012年 7月 11日
				US	7897937	B2	2011年 3月 1日
				EP	2107363	A1	2009年 10月 7日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)