



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103940787 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201310016989. 0

(22) 申请日 2013. 01. 17

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 付彦辉 罗志勇 纪伟 贾策  
张翔 仓怀兴 徐涛

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 曹玲柱

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 21/45 (2006. 01)

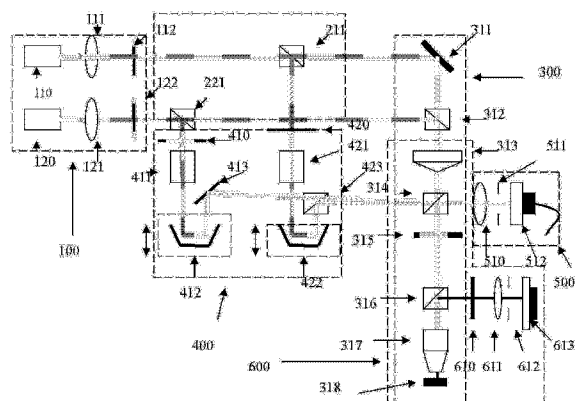
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

## (54) 发明名称

双波长量化相位成像和荧光成像联合系统

## (57) 摘要

本发明提供了一种双波长量化相位成像和荧光成像联合系统。本发明将共聚焦原理应用在量化相位成像,将荧光成像与量化相位成像结合,采用位相调制和双波长调制的方法,在提高了量化相位显微系统的信噪比和分辨率的同时,获得高分辨率的荧光图像,在细胞荧光成像、结构成像、物体内部结构、表面检测等方面具有良好的应用。



1. 一种双波长量化相位成像和荧光成像联合系统,其特征在于,包括:

光源系统 (100),用于提供不同波长的第一激光束和第二激光束;

分束组件 (200),用于将第一激光束分束为第一参考光束和第一干涉光束;将第二激光束分束为第二参考光束和第二干涉光束,第一参考光束和第二参考光束射入参考光路 (400);第一物光光束和第二物光光束射入物光光路 (300);

物光光路 (300),用于将第一物光光束和第二物光光束投射至样品上,携带样品信息的第一物光光束和第二物光光束由第五分光棱镜 (314) 反射至干涉成像系统 (500);同时,由第一物光光束和第二物光光束激发样品产生的荧光光束经第六分光棱镜 (316) 透射至荧光成像系统 (600);

参考光路 (400),用于将第一参考光束和第二参考光束投射至干涉成像系统 (500);

干涉成像系统 (500),用于将第一参考光束和第一物光光束,及第二参考光束和第二物光光束进行干涉成像;

荧光成像系统 (600),与所述物光光路 (300) 共用共聚焦成像部分,用于对第一物光光束和第二物光光束激发的荧光光束进行成像。

2. 根据权利要求 1 所述的显微镜,其特征在于,所述干涉成像系统 (500) 包括:成像透镜组 (510)、光阑 (511) 及干涉成像 CCD (512),其中:

第一参考光束与携带样品信息的第一物光光束由成像透镜组 (510) 成像,经过光阑 (511) 后,在干涉成像 CCD (512) 上发生干涉,形成带有物体信息的干涉图;

第二参考光束与携带样品信息的第二物光光束由成像透镜组 (510) 成像,经过光阑 (511) 后,在干涉成像 CCD (512) 上发生干涉,形成带有物体信息的干涉图。

3. 根据权利要求 1 所述的显微镜,其特征在于,所述参考光路 (400) 包括:第四半波片 (410)、第二长方体玻璃透镜 (411)、第二量化相位调整器 (412) 和第一反射镜 (413);第三半波片 (420)、第一长方体玻璃透镜 (421)、第一量化相位调整器 (422) 和第三分光棱镜 (423),其中:

第一参考光束经过第三半波片 (420) 和第一长方体玻璃透镜 (421) 后,由第一量化相位调整器 (422) 调整相位,并经第三分光棱镜 (423) 反射至干涉成像系统 (600);

第二参考光束经过第四半波片 (410) 和第二长方体玻璃透镜 (411) 后,由第二量化相位调整器 (412) 调整相位,经第一反射镜 (413) 反射,并由第三分光棱镜 (423) 透射至干涉成像系统 (500)。

4. 根据权利要求 3 所述的显微镜,其特征在于,所述第一量化相位调整器 (422) 和第二量化相位调整器 (412) 为双反射镜类型的位相调制器,其通过整体上下移动来调整第一参考光束 11 或第二参考光束 21 的光程。

5. 根据权利要求 4 所述的显微镜,其特征在于,所述第一长方体玻璃透镜 (421) 和第二长方体玻璃透镜 (411) 为长方体玻璃透镜或楔形玻璃透镜。

6. 根据权利要求 1 所述的显微镜,其特征在于,所述荧光成像系统 (600) 包括:微透镜阵列 (棱台或棱锥) (313)、第五分光棱镜 (314)、针孔阵列 (315)、第六分光棱镜 (316)、显微物镜 (317) 和位移台 (318)、滤光片 (610)、荧光成像透镜组 (611)、光阑 (612) 和 EMCCD (613),其中:

第一物光光束和第二物光光束照射在微透镜阵列 (313),产生具有一定空间周期排列

的阵列,该阵列通过第五分光棱镜(314)与针孔阵列(315)进行匹配,在经第六分光棱镜(316)和显微物镜(317)照射在位于位移台(318)上的样品上激发样品产生荧光,荧光光束经位移台(318)反射再由显微物镜(450)进行成像,经过第六分光棱镜(316)、滤光片(610),经荧光成像透镜组(611)、光阑(612)成像在EMCCD(613)上。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的显微镜,其特征在于,所述光源系统(100)包括:第一激光器(110)、第一扩束器(111)、第一半波片(112)、第二激光器(120)、第二扩束器(121)、第二半波片(122),其中:

第一激光器(110)发出第一波长的第一激光束,该第一激光束经第一扩束器(111)进行扩束准直,再经过第一半波片(112)后进入第一分束组件(200);

第二激光器(120)发出第二波长的第二激光束,该第二激光束经第二扩束器(121)进行扩束准直,再经过第二半波片(122)后进入第一分束组件(200)。

8. 根据权利要求7所述的显微镜,其特征在于,所述第一波长为346nm、495nm、514nm、556nm、647nm或710nm中的一种,第二波长为346nm、495nm、514nm、556nm、647nm或710nm中的另一种。

9. 根据权利要求1至6中任一项所述的显微镜,其特征在于,所述分束组件(200)包括相互错开的第一偏振分光棱镜(211)和第二偏振分光棱镜(221),其中:

第一激光束由第一偏振分光棱镜(211)分光为沿水平面方向传播的第一物光光束和沿垂直面方向传播的第一参考光光束;

第二激光束由第二偏振分光棱镜(221)分光为沿水平面方向传播的第二物光光束和沿垂直面方向传播的第二参考光光束。

10. 根据权利要求1至6中任一项所述的显微镜,其特征在于,所述物光光路(300)包括:第二反射镜(311)、第四分光棱镜(312)、微透镜阵列(棱台或棱锥)(313)、第五分光棱镜(314)、针孔阵列(315)、第六分光棱镜(316)、显微物镜(317)和位移台(318),其中:

第一物光光束12经过第二反射镜(311)反射后,经第四分光棱镜(312)透射,照射在微透镜阵列(313),从而产生具有一定空间周期排列的阵列,该阵列通过第五分光棱镜(314)与针孔阵列(315)进行匹配,在经第六分光棱镜(316)和显微物镜(317)照射在位于位移台(318)上的样品上,从而成为携带有样品信息的第一物光光束,经位移台(318)反射再由显微物镜450进行成像,经过第六分光棱镜(316),在与针孔阵列(315)匹配滤去杂光,最后投射至第五分光棱镜(314),经第五分光棱镜(314)反射成像到干涉成像系统(500);

第二物光光束经过第四分光棱镜(312)反射后,照射在微透镜阵列(313),从而产生具有一定空间周期排列的阵列,该阵列通过第五分光棱镜(314)与针孔阵列(315)进行匹配,在经第六分光棱镜(316)和显微物镜(317)照射在位于位移台(318)上的样品上,从而成为携带有样品信息的第一物光光束,经位移台(318)反射再由显微物镜(450)进行成像,经过第六分光棱镜(316),在与针孔阵列(315)匹配滤去杂光,最后投射至第五分光棱镜(314),经第五分光棱镜(314)反射成像到干涉成像系统(500)。

## 双波长量化相位成像和荧光成像联合系统

### 技术领域

[0001] 本发明涉及光学领域,尤其涉及一种新型的具有超高分辨率的基于共聚焦原理的双波长量化相位成像和荧光成像联合系统。

### 背景技术

[0002] 现代生物医学研究需要观察蛋白质在细胞三维空间内的精确定位和分布。蛋白质只有定位到特殊的亚细胞器和生理活性位点上才能正确发挥其生物学功能,而且其定位是一个动态过程。要正确认识和研究蛋白质的功能就必须对其进行标记从而研究其在不同生理状态下的定位变化。为达到这一目的,人们通常先对被研究分子进行荧光标记,获得荧光成像,再获得细胞透射成像,利用图像处理技术,将荧光图像和透射图像融合,获得分子在细胞中的定位和功能信息。由于光学系统的衍射,图像分辨率不高。

[0003] 透射显微成像可以提供细胞形态和结构信息,荧光显微成像可以提供被研究分子的功能、定位和反应动力学信息。相位成像技术利用不同物质折射率不同,使透射的激光产生相位差而发生干涉,通过对干涉图样的分析获得光路中不同位置的折射率,并转化为图像,使透射成像显微镜的光传播方向(Z轴方向)的分辨率可达到 nm 量级。荧光显微镜随着激光共聚焦、光敏定位荧光显微、单分子荧光干涉荧光显微等技术的发展,分子定位精度也达到 nm 量级。

[0004] 因此,进一步提高相位成像技术在 X-Y 平面的分辨率,并将该技术和高分辨率的荧光成像技术相结合,可以方便地观察并定量目标蛋白质在活细胞中的表达、定位、转运、以及与其他生物分子的相互作用,为生命科学研究提供新的研究手段。通过综合应用共聚焦荧光成像、光敏定位荧光成像技术的定位精度,量化相位成像显微镜在细胞形态结构成像的精度,提出了在共聚焦原理的前提下,将量化相位成像和荧光成像联合的概念,为超分辨在生物个体的应用提供了方案,另外与单波长量化相位成像相比,双波长通过对图像在非单色域进行散斑噪声平衡和平滑处理来提高分辨率,提高测量方法的灵敏度,可通过全场观测来提取绝对信息,通过不同波长同时提供待测物体的不同信息,还可以解决在单波长记录相位成像中无法避免的相移带来的信号含混的问题,大大提高了系统在 x、y、z 的分辨率。

[0005] 然而,在实现本发明的过程中,申请人发现,目前的显微镜难以获得靶分子在细胞中的精确定位,即无法把荧光图像和细胞结构图像融合,实现细胞结构与功能成像,从而造成研究工作的不便。

### 发明内容

[0006] (一) 要解决的技术问题

[0007] 为解决上述的一个或多个问题,本发明提供了一种双波长量化相位成像和荧光成像联合系统。

[0008] (二) 技术方案

[0009] 根据本发明的一个方面,提供了一种双波长量化相位成像和荧光成像联合系统。该联合系统包括:光源系统 100,用于提供不同波长的第一激光束和第二激光束;分束组件 200,用于将第一激光束分束为第一参考光束和第一干涉光束;将第二激光束分束为第二参考光束和第二干涉光束,第一参考光束和第二参考光束射入参考光路 400;第一物光光束和第二物光光束射入物光光路 300;物光光路 300,用于将第一物光光束和第二物光光束投射至样品上,携带样品信息的第一物光光束和第二物光光束由第五分光棱镜 314 反射至干涉成像系统 500;同时,由第一物光光束和第二物光光束激发样品产生的荧光光束经第六分光棱镜 316 透射至荧光成像系统 600;参考光路 400,用于将第一参考光束和第二参考光束投射至干涉成像系统 500;干涉成像系统 500,用于将第一参考光束和第一物光光束,及第二参考光束和第二物光光束进行干涉成像;荧光成像系统 600,与所述物光光路 300 共用共聚焦成像部分,用于对第一物光光束和第二物光光束激发的荧光光束进行成像。

[0010] (三) 有益效果

[0011] 从上述技术方案可以看出,本发明多电子束差速倍频管具有以下有益效果:

[0012] (1) 荧光成像与量化相位成像的结合,解决了细胞形态和结构不能同时测量的缺点,并且部分光路共用;

[0013] (2) 采用双波长光进行干涉成像,且用一个 CCD 进行同时记录,克服多个 CCD 记录的缺点;

[0014] (3) 引入位相调制结构,实现了在  $x$ 、 $y$ 、 $z$  平面上的超高分辨成像,并且实现了不同波长信息的分离;

[0015] (4) 将共聚焦显微技术原理应用在量化相位成像,实现  $x$ 、 $y$ 、 $z$  方向分辨率的提高。

#### 附图说明

[0016] 图 1 基于共聚焦原理的双波长量化相位成像和荧光成像联合系统示意图;

[0017] 图 2 微透镜阵列示意图;

[0018] 图 3a 为本发明实施例作为激光干涉元件的四棱锥的示意图;

[0019] 图 3b 为本发明实施例采用图 3a 所示四棱锥作为激光干涉元件所产生的激光干涉图样的示意图;

[0020] 图 4 为本发明实施例激光干涉元件为四棱锥时,所产生干涉场的光轴纵向剖面图;

[0021] 图 5a 为本发明实施例作为激光干涉元件的四棱台的示意图;

[0022] 图 5b 为本发明实施例采用图 5a 所示四棱锥作为激光干涉元件所产生的激光干涉图样的示意图;

[0023] 【主要元件符号说明】

[0024]

100-光源系统;	200-分束组件;
300-物光光路;	400-参考光路;
500 干涉成像系统;	600-荧光成像系统;
110-第一激光器;	111-第一扩束器;
112-第一半波片;	120-第二激光器;
121-第二扩束器;	122-第二半波片;

[0025]

211-第一偏振分光棱镜;	221-第二偏振分光棱镜;
311-第二反射镜;	312-第四分光棱镜 312;
313-微透镜阵列 (棱台或棱锥);	314-第五分光棱镜;
315-针孔阵列;	316-第六分光棱镜;
317-显微物镜;	318-位移台;
410-第四半波片;	411-第二长方体玻璃透镜;
412-第二量化相位调整器;	413-第一反射镜;
420-第三半波片;	421-第一长方体玻璃透镜;
422-第一量化相位调整器;	423-第三分光棱镜;
510-成像透镜组;	511-光阑;
512-干涉成像 CCD;	610-滤光片;
611-荧光成像透镜组;	612-光阑;
613-EMCCD。	

### 具体实施方式

[0026] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明进一步详细说明。

[0027] 需要说明的是,在附图或说明书描述中,相似或相同的部分都使用相同的图号。附图中未绘示或描述的实现方式,为所属技术领域普通技术人员所知的形式。另外,虽然本文可提供包含特定值的参数的示范,但应了解,参数无需确切等于相应的值,而是可在可接受的误差容限或设计约束内近似于相应的值。此外,以下实施例中提到的方向用语,例如“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”等,仅是参考附图的方向。因此,使用的方向用语是用来说明并非用来限制本发明。

[0028] 本发明提供了新型的具有超高分辨率的基于共聚焦原理的双波长量化相位成像和荧光成像联合系统,该系统将共聚焦原理应用在量化相位成像,并将荧光成像与量化相位成像结合,利用两者的优点,在细胞荧光成像、结构成像、物体内部结构、表面检测等方面具有良好的应用,为细胞形态和原位测量提供了一种新的手段。

[0029] 本发明的一个优先实施例结合附图详述如下：如图 1 基于共聚焦原理的双波长量化相位成像和荧光成像联合系统，包括光源系统 100、分束组件 200、物光光路 300、参考光光路 400、干涉成像系统 500 和荧光成像系统 600，其中物光光路 300 与荧光成像系统 600 共用共聚焦成像部分。以下对各组件进行详细说明。

[0030] 光源系统 100

[0031] 光源系统 100 提供不同波长的第一激光束 1 和第二激光束 2，包括：第一激光器 110、第一扩束器 111、第一半波片 112、第二激光器 120、第二扩束器 121、第二半波片 122。

[0032] 其中，第一激光器 110 发出波长为 346nm、495nm、514nm、556nm、647nm 或 710nm 的第一激光束 1，该第一激光束 1 经第一扩束器 111 进行扩束准直，再经过第一半波片 112 后进入第一分束组件 200，如图 1 中虚线所示。

[0033] 其中，第二激光器 120 发出波长为 346nm、495nm、514nm、556nm、647nm 或 710nm 的第二激光束（与第一激光束不同波长），该第二激光束经第二扩束器 121 进行扩束准直，再经过第二半波片 122 后进入分束组件 200，如图 1 中点划线所示。

[0034] 本领域技术人员应当清楚，该第一激光束和第二激光束的波长可以根据荧光激发的需要进行调整。

[0035] 分束组件 200

[0036] 第一分束组件 200 分别将第一激光束 1 和第二激光束 2 分束为参考光束和干涉光束，包括相互错开的第一偏振分光棱镜 211 和第二偏振分光棱镜 221；

[0037] 第一激光束 1 由第一偏振分光棱镜 211 分光为第一参考光束 11 和第一物光光束 12。其中，第一参考光束 11 射入参考光路 400；第一物光光束 12 射入物光光路 300。

[0038] 第二激光束 2 由第二偏振分光棱镜 221 分光为第二参考光束 21 和第二物光光束 22。其中，第二参考光束 21 射入参考光路 400；第二干涉光束 22 射入物光光路 300。

[0039] 物光光路 300

[0040] 物光光路 300 将第一物光光束 12 和第二物光光束 22 投射至样品上，携带样品信息的第一物光光束 12 和第二物光光束 22 经样品台 318 反射同时第五分光棱镜 314 反射成像到干涉成像系统 500。该物光光路包括第二反射镜 311、第四分光棱镜 312、微透镜阵列（棱台或棱锥）（如图 2）313、第五分光棱镜 314、针孔阵列 315、第六分光棱镜 316、显微物镜 317 和位移台 318 组成。

[0041] 第一物光光束 12 经过第二反射镜 311 反射后，经第四分光棱镜 312 透射，照射在微透镜阵列（棱台或棱锥）313，从而产生具有一定空间周期排列的阵列（如图 3、5），该阵列通过第五分光棱镜 314 与针孔阵列 315 进行匹配，在经第六分光棱镜 316 和显微物镜 317 照射在位于位移台 318 上的样品上，从而成为携带有样品信息的第一物光光束 12'，经位移台 318 反射再由显微物镜 450 进行成像，经过第六分光棱镜 316，在与针孔阵列 315 匹配滤去杂光，最后投射至第五分光棱镜 314，经第五分光棱镜 314 反射成像到干涉成像系统 500。

[0042] 第二物光光束 22 经过第四分光棱镜 312 反射后，照射在微透镜阵列（棱台或棱锥）313，从而产生具有一定空间周期排列的阵列（如图 3、5），该阵列通过第五分光棱镜 314 与针孔阵列 315 进行匹配，在经第六分光棱镜 316 和显微物镜 317 照射在位于位移台 318 上的样品上，从而成为携带有样品信息的第一物光光束 12'，经位移台 318 反射再由显微

物镜 450 进行成像,经过第六分光棱镜 316,在与针孔阵列 315 匹配滤去杂光,最后投射至第五分光棱镜 314,经第五分光棱镜 314 反射成像到干涉成像系统 500。

[0043] 其中第五分光棱镜 314 将第一参考光束 11 和第二参考光束 12 透射到干涉成像系统 500,将携带有样品信息的第一物光光束 12 和第二物光光束 22 反射到干涉成像系统 500。

[0044] 参考光路 400

[0045] 参考光路 400 分别对第一参考光束 11 和第二参考光束 21 的相位进行调节,并将两者射入第五分光棱镜 314,经第五分光棱镜 314 透射成像到干涉成像系统 500,如图 1 第三分光棱镜 415 光路后端的实线所示。该参考光束系统 400 包括:第二偏振分光棱镜 221 光路后端的第四半波片 410、第二长方体玻璃透镜 411、第二量化相位调整器 412 和第一反射镜 413;以及位于第一偏振分光棱镜 211 光路后端的第三半波片 420、第一长方体玻璃透镜 421、第一量化相位调整器 422 和第三分光棱镜 423。

[0046] 第一参考光束 11 经过位于第一分光棱镜 211 后端的第三半波片 420 和第一长方体玻璃透镜 421 后,由第一量化相位调整器 422 调整相位,并经第三分光棱镜 423 反射至干涉成像系统 500。

[0047] 第二参考光束 21 经过位于第二分光棱镜 221 后端的第四半波片 410 和第二长方体玻璃透镜 411 后,由第二量化相位调整器 412 调整相位,经反射镜 413 反射,并由第三分光棱镜 423 透射至干涉成像系统 500。

[0048] 其中,量化位相调制器为双反射镜类型的量化位相调制器,其通过整体上下移动来调整第一参考光束 11 和第二参考光束 21 的光程,进而实现物光与参考光微小的光程差。

[0049] 干涉成像系统 500

[0050] 干涉成像系统 500 将第一参考光束 11 和第一物光光束 12,及第二参考光束 21 和第二物光光束 22 进行干涉成像,并由同一个 CCD 进行接收。该干涉成像系统 500 包括:成像透镜组 510、光阑 511 及干涉成像 CCD 512 组成。

[0051] 第一参考光束 11 与经过样品后携带样品信息的第一物光光束 12 经过成像透镜组 510 成像,经过光阑 511 后,在干涉成像 CCD512 上发生干涉,形成带有物体信息的干涉图,如图 3 所示。

[0052] 同样,第二参考光束 21 与经过样品后携带样品信息的第二物光光束 22 经过成像透镜组 510 成像,经过光阑 511 后,在干涉成像 CCD 512 上发生干涉,形成带有物体信息的干涉图。

[0053] 荧光成像系统 600

[0054] 荧光成像系统 600 可以为光敏定位荧光系统或受激发射损耗显微成像系统等荧光成像,用于将荧光光束 33 进行成像,包括:微透镜阵列(棱台或棱锥)313、第五分光棱镜 314、针孔阵列 315、第六分光棱镜 316、显微物镜 317 和位移台 318、滤光片 610、荧光成像透镜组 611、光阑 612 和 EMCCD 613。

[0055] 第一物光光束 12 和第二物光光束 22 照射在微透镜阵列(棱台或棱锥)313,从而产生具有一定空间周期排列的阵列(如图 3、5),该阵列通过第五分光棱镜 314 与针孔阵列 315 进行匹配,在经第六分光棱镜 316 和显微物镜 317 照射在位于位移台 318 上的样品上激发样品产生荧光 33,荧光光束 33 由显微物镜 450 进行成像,经过第六分光棱镜 316、滤光片



610,经荧光成像透镜组 611、光阑 612 成像在 EMCCD 613 上。

[0056] 至此,本实施例透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜介绍完毕。

[0057] 需要说明的是,上述对各元件的定义并不仅限于实施方式中提到的各种具体结构或形状,例如:长方体玻璃透镜可以用楔形透镜来代替,微透镜阵列可以为棱台也可以为棱锥。

[0058] 综上所述,本发明采用双波长光分别经过被测物体,所形成的带有被测物体信息的光与经过位相调制的参考光发生干涉,被 CCD 接收、记录,并利用位相调制结构实现不同波长信息的分离。本发明中,将共聚焦原理应用在量化相位成像,将荧光成像与量化相位成像结合,采用位相调制和双波长调制的方法,在提高了量化相位显微系统的信噪比和分辨率的同时,获得高分辨率的荧光图像,在细胞荧光成像、结构成像、物体内部结构、表面检测等方面具有良好的应用,为细胞形态和原位测量提供了一种新的手段。

[0059] 以上所述的具体实施例,对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明,所应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施例而已,并不用于限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

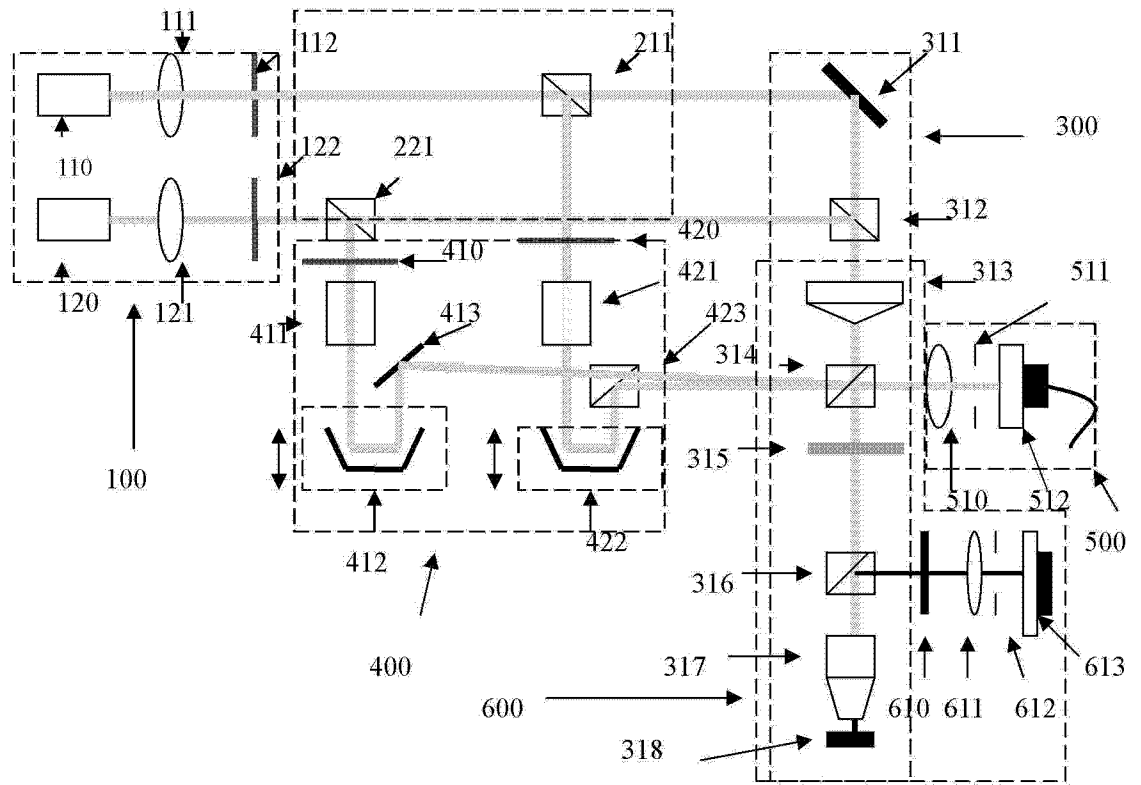


图 1

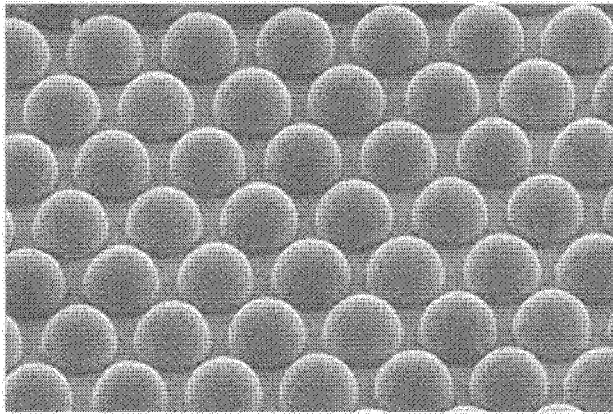


图 2

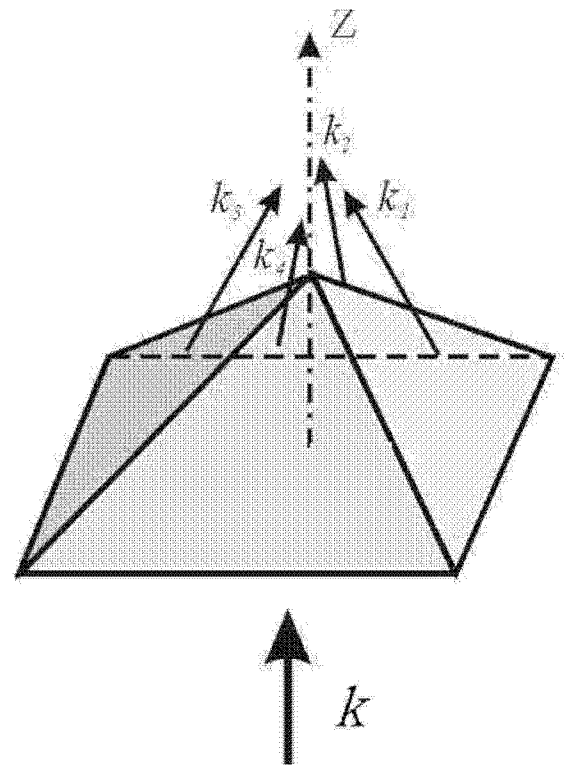


图 3a

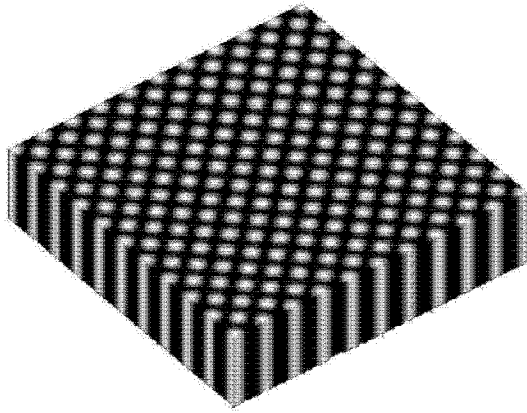


图 3b

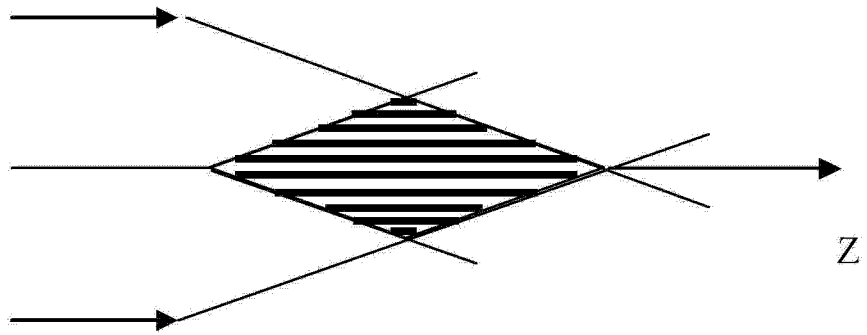


图 4

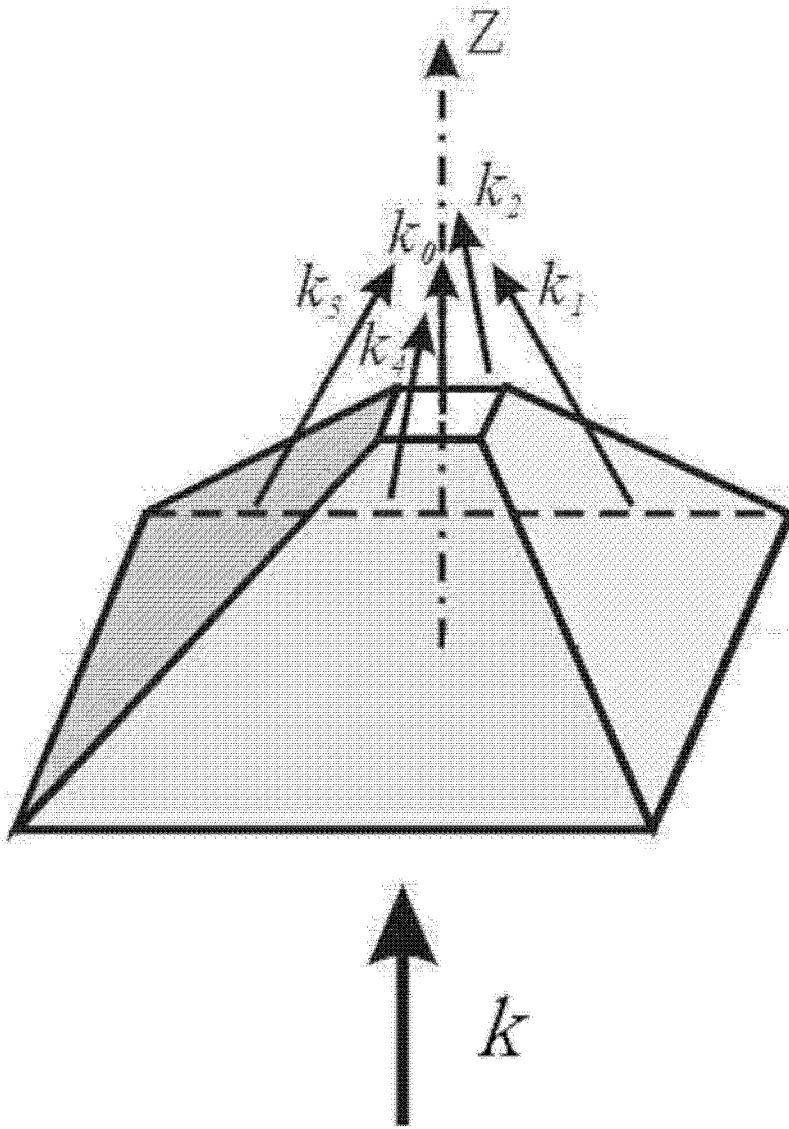


图 5a

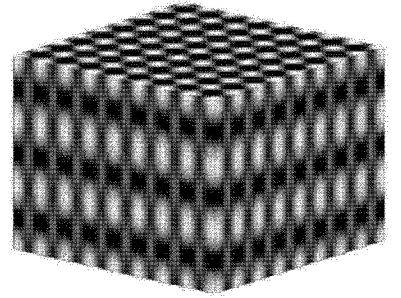


图 5b