



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103941385 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201310018167. 6

(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 罗志勇 付彦辉 张翔 纪伟  
贾策 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.

G02B 21/06 (2006. 01)

G02B 21/36 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 21/45 (2006. 01)

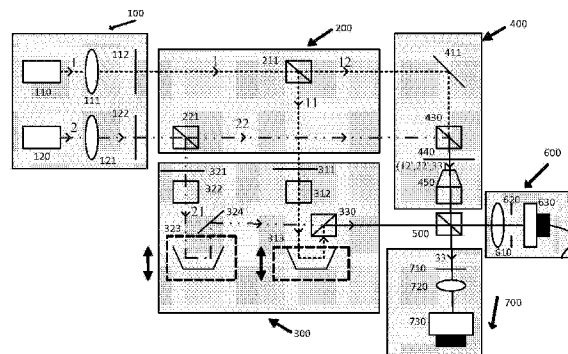
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

## (54) 发明名称

透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜

## (57) 摘要

本发明提供了一种透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜。该显微镜包括：光源系统 100、第一分束组件 200、参考光路 300、物光光路 400、第五分光棱镜 500、干涉成像系统 600 以及荧光成像系统 700。本发明将荧光成像技术和量化相位成像技术相结合，实现了细胞结构和荧光分子同时成像。



1. 一种透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜,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(1)和第二激光束(2);

第一分束组件(200),用于将第一激光束(1)分束为第一参考光束(11)和第一物光光束(12);将第二激光束分束为第二参考光束(21)和第二物光光束(22),第一参考光束(11)和第二参考光束(21)射入参考光路(300);第一物光光束(12)和第二物光光束(22)射入物光光路(400);

参考光路(300),用于将第一参考光束(11)和第二参考光束(21)投射至第五分光棱镜(500);

物光光路(400),用于将第一物光光束(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)被投射至第五分光棱镜(500);同时,由第一物光光束(12)和第二物光光束(22)激发样品产生的荧光光束也被投射至第五分光棱镜(500);

第五分光棱镜(500),用于将携带样品信息的第一物光光束(12)和第二物光光束(22)反射至干涉成像系统(600);同时,由第一物光光束(12)和第二物光光束(22)激发样品产生的荧光光束被第五分光棱镜(500)透射至荧光成像系统(700);

干涉成像系统(600),用于将第一参考光束(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;

荧光成像系统(700),用于对第一物光光束(12)和第二物光光束(22)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(600)包括:成像透镜组(610)、光阑(620)及干涉成像 CCD(630),其中:

第一参考光束(11)与携带样品信息的第一物光光束(12)由成像透镜组(610)成像,经过光阑(620)后,在干涉成像 CCD(630)上发生干涉,形成带有物体信息的干涉图;

第二参考光束(21)与携带样品信息的第二物光光束(22)由成像透镜组(610)成像,经过光阑(620)后,在干涉成像 CCD(630)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(300)包括:第三半波片(311)、第一长方体玻璃透镜(312)、第一量化相位调整器(313)、第三分光棱镜(330)、第四半波片(321)、第二长方体玻璃透镜(322)、第二量化相位调整器(323)和第一反射镜(324),其中:

第一参考光束(11)经过第三半波片(311)和第一长方体玻璃透镜(312)后,由第一量化相位调整器(313)调整相位,并经第三分光棱镜(330)反射至干涉成像系统(600);

第二参考光束(21)经过第四半波片(321)和第二长方体玻璃透镜(322)后,由第二量化相位调整器(323)调整相位,经第一反射镜(324)反射,并由第三分光棱镜(330)透射至干涉成像系统(600)。

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(313)和第二量化相位调整器(311)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(312)和第二长方体玻璃透镜(322)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(700)包括:滤光片(710)、荧光成像透镜组(720)和 EMCCD(730),其中:

荧光光束透过滤光片(710),由荧光成像透镜组(720)成像在 EMCCD(730)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,所述第一波长和第二波长选自于以下波长组成的群组中不同的两个:346nm、495nm、514nm、556nm、647nm 和 710nm。

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,所述第一分束组件(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(12)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(22)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(400)包括:第二反射镜(411)、第四分光棱镜(430)、位移台(440)和显微物镜(450),其中:

第一物光光束(12)经过第二反射镜(411)反射后,经第四分光棱镜(430)透射,照射在位于位移台(440)上的样品上,从而成为携带有样品信息的第一物光光束(12),再由显微物镜(450)进行成像,投射至第五分光棱镜(500);

第二物光光束(22)经第四分光棱镜(430)反射,照射在位于位移台(440)上的样品上,从而成为携带有样品信息的第二物光光束(22),再由显微物镜(450)进行成像,投射至第五分光棱镜(500);

第一物光光束(12)和第二物光光束(22)在样品台(440)处激发样品产生荧光光束 33,该荧光光束 33 经显微物镜(450)进行成像,投射至第五分光棱镜(500)。

## 透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜

### 技术领域

[0001] 本发明涉及光学领域,尤其涉及一种可以将细胞形态结构成像和荧光功能成像同时实现,并且在细胞、晶体生长观察等方面具有良好的应用前景的一种透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜。

### 背景技术

[0002] 生命科学是以实验观察为主的一门学科,实验手段和工具决定了观察的真实程度和分辨能力;光学显微镜的出现促使普通细胞生物学的诞生,电子显微镜的出现则催生了细胞超微结构学的研究。

[0003] 近两年在光学显微技术方面,出现了以光激活定位显微技术(photo-activated localization microscopy,简称PALM),随机光学重构显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy,简称STORM),受激发射损耗显微技术(stimulated emission depletion,简称STED),饱和结构照明显微技术(saturated structure illumination microscopy,简称SSIM)等为代表的突破光学分辨率极限的超分辨光学显微技术,利用这项技术,人们对靶分子进行标记并且进行超高分辨荧光成像。

[0004] 量化相位成像显微镜通过对被测对象的无损干涉,可以实现高分辨对生物样品生长的动态观察、晶体生长的实时观察,具有无法比拟的优点。另外与单波长相比,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,本发明提供了一种透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜。

[0008] (二)技术方案

[0009] 根据本发明的一个方面,提供了一种透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜。该显微镜包括:光源系统100,用于提供不同波长的第一激光束1和第二激光束2;第一分束组件200,用于将第一激光束1分束为第一参考光束11和第一物光光束12;将第二激光束2分束为第二参考光束21和第二物光光束22,第一参考光束11和第二参考光束21射入参考光路300;第一物光光束12和第二物光光束22射入物光光路400;参考光路300,用于将第一参考光束11和第二参考光束21投射至第五分光棱镜;物光光路400,用于将第一物

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 由第五分光棱镜 500 反射至干涉成像系统 600 ;同时,由第一物光光束 12 和第二物光光束 22 激发样品产生的荧光光束 33 经第五分光棱镜 500 透射至荧光成像系统 700 ;干涉成像系统 600,用于将第一参考光束 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 ;以及荧光成像系统 700,用于对第一物光光束 21 和第二物光光束 22 激发的荧光光束 33 进行成像。

[0010] (三)有益效果

[0011] 从上述技术方案可以看出,本发明透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜具有以下有益效果:

[0012] (1) 将荧光成像技术和量化相位成像技术相结合,实现了细胞结构和荧光分子同时成像;

[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,达到了不同波长信息的分离的目的,实现了在 X、Y、Z 平面上的超高分辨成像。

#### 附图说明

[0015] 图 1 为本发明实施例透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜的结构示意图;

[0016] 图 2 为图 1 所示显微镜中放置被测细胞样品的位移台的示意图;

[0017] 图 3 为图 1 所示显微镜中干涉成像系统获得的量化相位图。

#### 【本发明主要元件符号说明】

[0019] 100- 光源系统; 200- 第一分束组件;

[0020] 300- 参考光路; 400- 物光光路;

[0021] 500- 第五分光棱镜; 600 干涉成像系统;

[0022] 700- 荧光成像系统;

[0023] 110- 第一激光器; 111- 第一扩束器;

[0024] 112- 第一半波片; 120- 第二激光器;

[0025] 121- 第二扩束器; 122- 第二半波片;

[0026] 211- 第一偏振分光棱镜; 221- 第二偏振分光棱镜;

[0027] 311- 第三半波片; 312- 第一长方体玻璃透镜;

[0028] 313- 第一量化相位调整器; 330- 第三分光棱镜;

[0029] 321- 第四半波片; 322- 第二长方体玻璃透镜;

[0030] 323- 第二量化相位调整器; 324- 第一反射镜;

[0031] 411- 第二反射镜; 430- 第四分光棱镜;

[0032] 440- 位移台; 450- 显微物镜;

[0033] 610 成像透镜组; 620- 光阑;

[0034] 630- 干涉成像 CCD; 710- 滤光片;

[0035] 720- 荧光成像透镜组; 730-EMCCD。

## 具体实施方式

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 本发明提供了一种透射式量化相位和荧光联合成像的显微镜,其在双波长条件下将位相调制透射式量化相位成像显微镜和荧光成像技术结合,利用两者的优点,实现实时观察细胞和晶体生长。

[0039] 本发明的一个优先实施例结合附图详述如下:如图1透射式量化相位和荧光联合成像系统,包括光源系统100、第一分束组件200、参考光路300、物光光路400、第五分光棱镜500、干涉成像系统600和荧光成像系统700。以下对各组件进行详细说明。

[0040] 光源系统100

[0041] 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。

[0042] 其中,第一激光器110发出第一波长第一激光束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。

[0043] 其中,第二激光器120发出第二波长的第二激光束(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后进入第一分束组件200,如图1中点划线所示。

[0044] 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。优选地,所述第一波长和第二波长选自于以下波长组成的群组中不同的两个:346nm、495nm、514nm、556nm、647nm和710nm。

[0045] 第一分束组件200

[0046] 第一分束组件200分别将第一激光束1和第二激光束2分束为参考光束和物光光束,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;

[0047] 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300;第一物光光束12射入物光光路400。

[0048] 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300;第二物光光束22射入物光光路400。

[0049] 参考光路300

[0050] 参考光路300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500,如图1第三分光棱镜330光路后端的实线所示。该参考光束系统300包括:位于第一偏振分光棱镜211光路后端的第三半波片311、第一长方体玻璃透镜312、第一量化相位调整器313和第三分光棱镜330;以及位于第二偏振分光棱镜221光路后端的第四半波片321、第二长方体玻璃透镜322、第二量化相位调整器323和第一反射

镜 324。

[0051] 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 311 和第一长方体玻璃透镜 312 后,由第一量化相位调整器 313 调整相位,并经第三分光棱镜 330 反射至干涉成像系统 600。

[0052] 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 321 和第二长方体玻璃透镜 322 后,由第二量化相位调整器 323 调整相位,经反射镜 324 反射,并由第三分光棱镜 330 透射至干涉成像系统 600。

[0053] 其中,位相调制器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 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。该位相调制器包括反射面相对的两反射镜,每一反射镜的反射面均与入射光线呈  $45^\circ$ 。

[0054] 物光光路 400

[0055] 物光光路 400 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 同时成像至第五分光棱镜 500。该物光光路包括第二反射镜 411、第四分光棱镜 430、位移台 440 和显微物镜 450。

[0056] 第一物光光束 12 经过第二反射镜 411 反射后,经第四分光棱镜 430 透射,照射在位于位移台 440 上的样品上,从而成为携带有样品信息的第一物光光束  $12'$ ,再由显微物镜 450 进行成像,投射至第五分光棱镜 500。

[0057] 第二物光光束 22 经第四分光棱镜 430 反射,照射在位于位移台 440 上的样品上,从而成为携带有样品信息的第二物光光束  $22'$ ,再由显微物镜 450 进行成像,投射至第五分光棱镜 500。

[0058] 同时,如图 2 所示,第一物光光束 12 和第二物光光束 22 在样品台 440 处激发样品产生荧光光束 33,该荧光光束 33 经显微物镜 450 进行成像,投射至第五分光棱镜 500。

[0059] 第五分光棱镜 500

[0060] 第五分光棱镜 500 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 600,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 600。

[0061] 同时,荧光光束 33 经第五分光棱镜 500 后透射至荧光成像系统 700。

[0062] 干涉成像系统 600

[0063] 干涉成像系统 600 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 600 包括:成像透镜组 610、光阑 620 及干涉成像 CCD 630 组成。

[0064] 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 610 成像,经过光阑 620 后,在干涉成像 CCD 630 上发生干涉,形成带有物体信息的干涉图,如图 3 所示。

[0065] 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 610 成像,经过光阑 620 后,在干涉成像 CCD 630 上发生干涉,形成带有物体信息的干涉图,如图 3 所示。

[0066] 荧光成像系统 700

[0067] 荧光成像系统 700 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:滤光片 710、荧光成像透镜组 720 和 EMCCD

730。

[0068] 第一物光光束 12 和第二物光光束 22 在样品台 440 处激发样品产生荧光, 荧光光束 33 经显微物镜 450 接收, 透过第五分光棱镜 500、滤光片 710, 由荧光成像透镜组 720 成像在 EMCCD 730 上。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。本发明的特点: (1) 将荧光成像技术和量化相位成像技术相结合, 实现了细胞结构和荧光分子同时成像; (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; (3) 引入位相调制结构, 达到了不同波长信息的分离的目的, 实现了在 X、Y、Z 平面上的超高分辨成像。

[0072] 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。



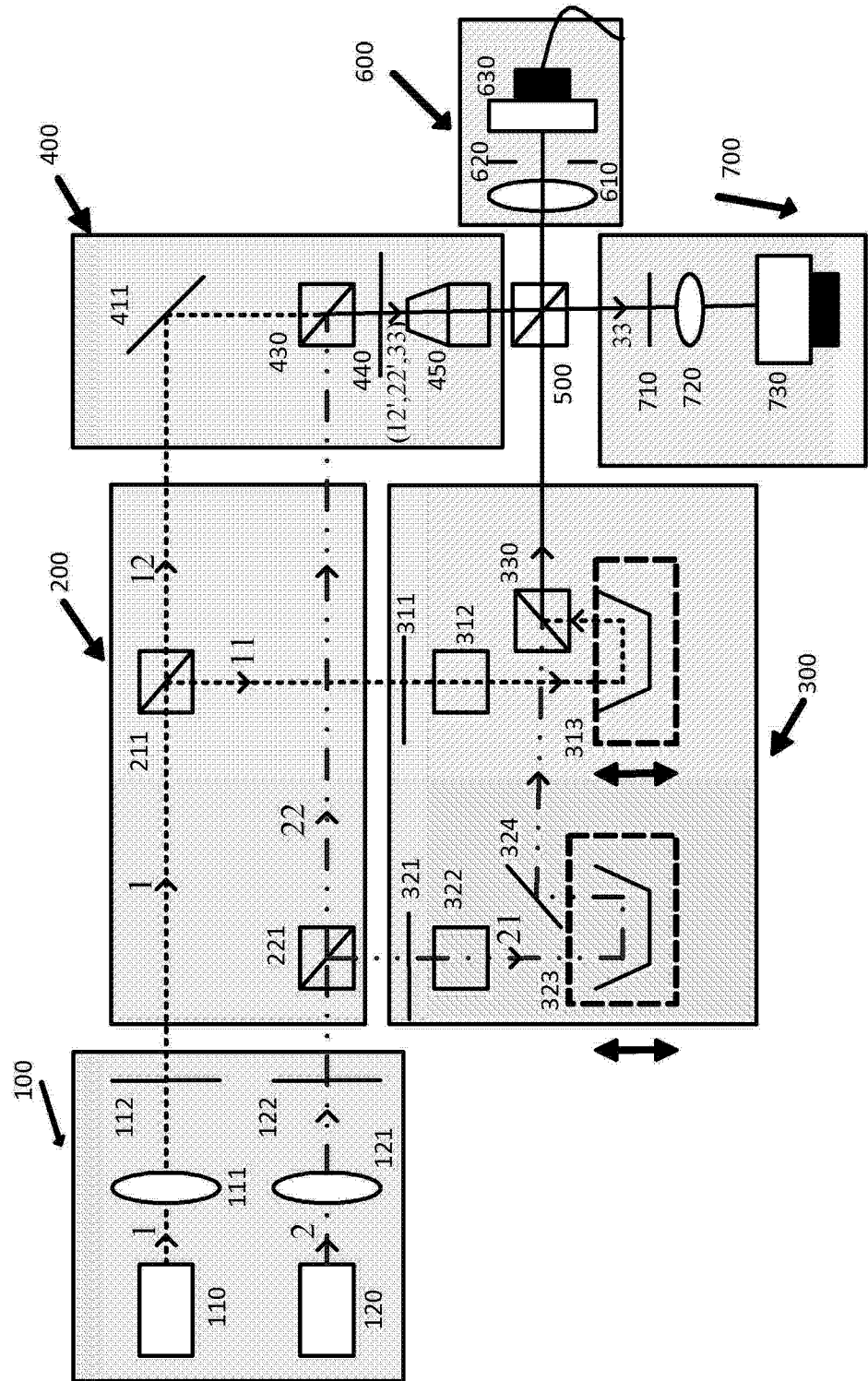


图 1

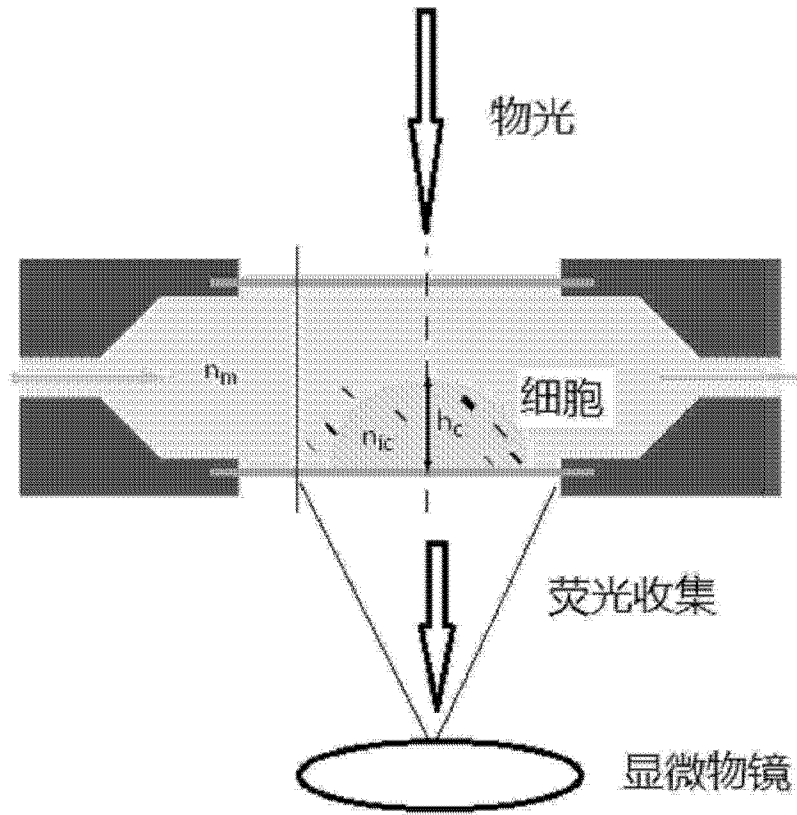


图 2

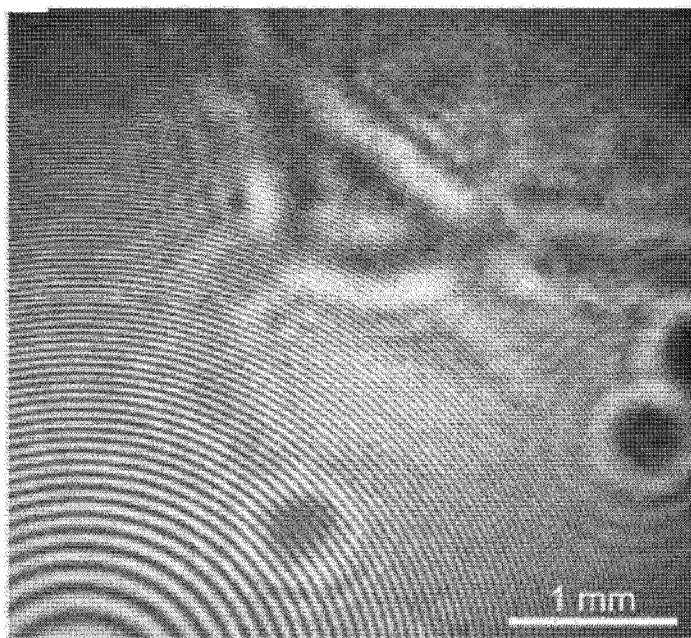


图 3