



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110007453 A

(43)申请公布日 2019. 07. 12

(21)申请号 201910393370.9

(22)申请日 2019.05.13

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100010 北京市朝阳区大屯路十五号

(72)发明人 谷陆生 纪伟 徐涛 付彦辉

(74)专利代理机构 成都方圆聿联专利代理事务
所(普通合伙) 51241

代理人 曹少华

(51)Int.Cl.

G02B 21/00(2006.01)

G02B 21/36(2006.01)

G02B 26/10(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/01(2006.01)

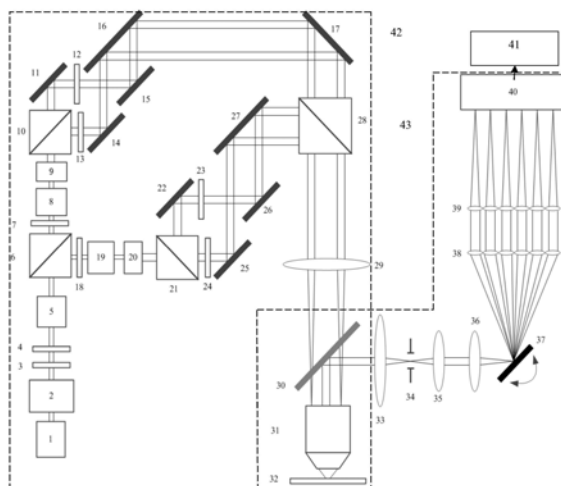
权利要求书2页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

一种多照明模式的荧光信号测量装置及其
测量方法和应用

(57)摘要

本发明属于荧光信号测量技术领域,涉及一种多照明模式的荧光信号测量装置,在照明激发光路中对激发光进行调制,通过物镜之后在样品处生成不同相位的激发照明图案,在荧光收集光路中设置高速切换装置,切换样品的荧光图像在光电传感器靶面上的位置,通过多照明激发光路与荧光成像光路的同步运行,在一次曝光后能够同时得到多个子图像,即对应多种照明模式下的荧光信号。本发明能够在多种照明模式下对单分子进行荧光信号测量,并能够提高对单分子的定位精度,可以在同等光子数条件下实现更高的分辨能力。



1. 一种多照明模式的荧光信号测量装置,其特征在于,包括多照明激发系统(42)、荧光成像系统(43)和信号控制处理系统(41);其中多照明激发系统(42)用于生成X和Y方向不同相位的多照明激发图案,对样品进行激发;荧光成像系统(43)用于收集和扫描不同相位激发照明图案激发产生的荧光子图像,使得在一幅荧光图像中包含N幅荧光子图像;信号控制处理系统(41)用于控制多照明激发系统(42)的激发光闭合、调制器件的相位变换和共振扫描振镜的扫描以及各部分顺序、快速的切换;还包括荧光图像的处理。

2. 根据权利要求1所述的一种多照明模式的荧光信号测量装置,其特征在于:所述的多照明激发系统(42)包括激光器(1),激光器(1)的光路上依次设有声光调制器(2)、第一1/2波片(3)、检偏器(4)、第一电光调制器(5)、第一偏振分光棱镜(6);

光束经过第一偏振分光棱镜(6)分成两个光路即光路A和光路B;

光路A依次设有第二1/2波片(7)、第二电光调制器(8)、第一扩束镜、第二偏振分光棱镜(10);第二偏振分光棱镜(10)分有两个光路:第一光路上依次设有第一反射镜(11)、第三1/2波片(12)、第三反射镜(15);第二个光路上依次设有第四1/2波片(13)、第二反射镜(14);两个光路然后均依次通过第四反射镜(16)、第五反射镜(17);

光路B依次设有第五1/2波片(18)、第三电光调制器(19)、第二扩束镜(20)、第三偏振分光棱镜(21);第三偏振分光棱镜(21)分有两个管理,第一光路上依次设有第六反射镜(22)、第六1/2波片(23)、第七反射镜(26);第二个光路上依次设有第七1/2波片(24)、第六反射镜(25);两个光路然后均依次通过第八反射镜(27);

第五反射镜(17)和第五反射镜(17)的反射光路分别进入第四偏振分光棱镜(28);第四偏振分光棱镜(28)的出光路上设有第一透镜(29);第一透镜(29)的光路进入荧光成像系统(43)的二向色分光镜(30)。

3. 根据权利要求1所述的一种多照明模式的荧光信号测量装置,其特征在于:所述的荧光成像系统(43)由物镜(31)、二向色分光镜(30)、第二透镜(33)、光阑(34)、第三透镜(35)、第四透镜(36)、共振扫描振镜(37)、第五透镜组(38)、第六透镜组(39)和光电传感器(40)组成;二向色分光镜(30)、物镜(31)、样品(32)在同一光路上;二向色分光镜(30)的分光路上依次设有第二透镜(33)、光阑(34)、第三透镜(35)、第四透镜(36)、共振扫描振镜(37);共振扫描振镜(37)的另外一光路上依次设有第五透镜组(38)、第六透镜组(39)和光电传感器(40);其中第五透镜组(38)和第六透镜组(39)各包含六个分透镜,六个分透镜用于不同相位下的荧光信号收集。

4. 根据权利要求1所述的一种多照明模式的荧光信号测量装置,其特征在于:所述的激光器1的光源为连续、单纵模的光源;各个调制器的转换频率至少1MHZ;共振扫描振镜(37)扫描频率至少4kHz。

5. 一种多照明模式的荧光信号测量方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 光源发出激发光,激发光经过调制器件调制后通过物镜照射在样品处,形成可控的激发照明图案,调制器件控制N种激发照明图案的切换以及激发光的打开和关闭;

(2) 样品受到第一种激发照明图案激发并发射荧光信号,荧光信号通过物镜收集后汇聚在共振扫描振镜镜面上,经共振扫描振镜快速扫描,通过N组共轭透镜组中的第一组透镜汇聚到光电传感器靶面位置1处,对荧光信号进行积分;然后切换到第二种激发照明图案激发样品并发射荧光信号,荧光信号通过物镜收集后汇聚在共振扫描振镜镜面上,经共振扫

描振镜快速扫描,通过N组共轭透镜组中的第二组透镜汇聚到光电传感器靶面位置2处,对荧光信号进行积分;依次循环,激发照明图案切换N次;

(3) 在光电传感器曝光过程中,重复步骤2若干次,最终在曝光结束得到一幅荧光图像,其中包含N个荧光子图像,然后对荧光信号图像进行处理分析。

6. 根据权利要求5所述的一种多照明模式的荧光信号测量方法,其特征在于:当荧光光束处于两组透镜的交界处时,激发光处于关闭状态;当荧光光束完全位于某一组共轭透镜的通光孔径内时,激发光处于打开状态。

7. 根据权利要求5所述的一种多照明模式的荧光信号测量方法,其特征在于:在一个曝光周期内,需要共振扫描振镜循环扫描若干周期;对于同一激发照明图案,在一个曝光周期内对应的荧光信号在光电传感器靶面的同一部分进行积分,最终曝光结束后在光电传感器上同时得到N个荧光子图像,分别对应N种不同的激发照明图案。

8. 根据权利要求5所述的一种多照明模式的荧光信号测量方法,其特征在于:所述的荧光光束聚焦在共振扫描振镜镜面上,并且共振扫描振镜镜面处于共轭透镜组的焦点处。

9. 根据权利要求5所述的一种多照明模式的荧光信号测量方法的应用,其特征在于:当照明图案为不同相位的X和Y方向条纹时,该测量方法用于荧光单分子定位测量。

10. 根据权利要求5所述的一种多照明模式的荧光信号测量方法的应用,其特征在于:当照明图案为不同方向,且每个方向包含不同相位的若干条纹时,该测量方法用于结构光照明显微成像。

一种多照明模式的荧光信号测量装置及其测量方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于荧光信号测量技术领域,涉及一种多照明模式的荧光信号测量装置及其测量方法和应用。

技术背景

[0002] 传统的光学显微镜由于光的衍射现象导致了分辨率极限的存在,一般为侧向200nm左右,轴向500nm左右。而近年来基于单分子定位的超分辨显微成像技术能够突破这种分辨率限制。这种成像技术依赖于对单个分子的荧光信号的精确定位,因此对单分子定位的精度直接影响到分辨能力。通常的定位方式是对荧光图像中的单分子图像进行图像拟合,并对图像的中心进行估计,进而得到单分子的位置。这种方式无法充分利用物镜的数值孔径,从而限制了定位精度的提高。同时,基于图像拟合的定位方式也会受到单分子图像形状的影响,进一步导致定位精度的下降,除此以外单分子在发光时是不连续的,存在闪烁以及漂白的现象,导致定位精度差、成像时间长。因此,解决上述问题对单分子图像具有重要的意义和应用价值。

发明内容

[0003] 为了减少现有多照明模式荧光测量受到样品变化的影响,本发明提出了一种多照明模式的荧光信号测量装置及其测量方法和应用,通过将激发光的调制、光源的闭合、不同相位荧光信号在光电传感器靶面的成像进行同步,实现了多种照明模式下对快速变化荧光信号的测量。通过使用不同相位及方向的激发照明图案,实现了对单分子荧光信号测量,并提高了单分子的定位精度。

[0004] 本发明的目的是通过下述技术方案实现的。

[0005] 首先,一种多照明模式的荧光信号测量装置,包括多照明激发系统、荧光成像系统和信号控制处理系统;其中多照明激发系统用于生成X和Y方向不同相位的多照明激发图案,对样品进行激发;荧光成像系统用于收集和扫描不同相位激发照明图案激发产生的荧光光子图像,使得在一幅荧光图像中包含N幅荧光光子图像;信号控制处理系统用于控制多照明激发系统的激发光闭合、调制器件的相位变换和共振扫描振镜的扫描以及各部分顺序、快速的切换;还包括荧光图像的处理。

[0006] 进一步的,所述的多照明激发系统包括激光器,激光器的光路上依次设有声光调制器、第一1/2波片、检偏器、第一电光调制器、第一偏振分光棱镜;

[0007] 光束经过第一偏振分光棱镜分成两个光路即光路A和光路B,

[0008] 光路A依次设有第二1/2波片、第二电光调制器、第一扩束镜、第二偏振分光棱镜;第二偏振分光棱镜分有两个光路:第一光路上依次设有第一反射镜、第三1/2波片、第三反射镜;第二个光路上依次设有第四1/2波片、第二反射镜;两个光路然后均依次通过第四反射镜、第五反射镜;

[0009] 光路B依次设有第五1/2波片、第三电光调制器、第二扩束镜、第三偏振分光棱镜;

第三偏振分光棱镜分有两个管理,第一光路上依次设有第六反射镜、第六1/2波片、第七反射镜;第二个光路上依次设有第七1/2波片、第六反射镜;两个光路然后均依次通过第八反射镜;

[0010] 第五反射镜和第五反射镜的反射光路分别进入第四偏振分光棱镜;第四偏振分光棱镜的出光路上设有第一透镜;第一透镜的光路进入荧光成像系统的二向色分光镜。

[0011] 进一步的,所述的荧光成像系统由物镜、二向色分光镜、第二透镜、光阑、第三透镜、第四透镜、共振扫描振镜、第五透镜组、第六透镜组和光电传感器组成;二向色分光镜、物镜、样品在同一光路上;二向色分光镜的分光路上依次设有第二透镜、光阑、第三透镜、第四透镜、共振扫描振镜;共振扫描振镜的另外一光路上依次设有第五透镜组、第六透镜组和光电传感器;其中第五透镜组和第六透镜组各包含六个分透镜,六个分透镜用于不同相位下的荧光信号收集。

[0012] 优选的,所述的激光器的光源为连续、单纵模的光源;各个调制器的转换频率至少1MHZ;共振扫描振镜扫描频率至少4kHz。

[0013] 本发明还提供一种多照明模式的荧光信号测量方法,包括以下步骤:

[0014] (1) 光源发出激发光,激发光经过调制器件调制后通过物镜照射在样品处,形成可控的激发照明图案,调制器件控制N种激发照明图案的切换以及激发光的打开和关闭;

[0015] (2) 样品受到第一种激发照明图案激发并发射荧光信号,荧光信号通过物镜收集后汇聚在共振扫描振镜镜面上,经共振扫描振镜快速扫描,通过N组共轭透镜组中的第一组透镜汇聚到光电传感器靶面位置1处,对荧光信号进行积分;然后切换到第二种激发照明图案激发样品并发射荧光信号,荧光信号通过物镜收集后汇聚在共振扫描振镜镜面上,经共振扫描振镜快速扫描,通过N组共轭透镜组中的第二组透镜汇聚到光电传感器靶面位置2处,对荧光信号进行积分;依次循环,激发照明图案切换N次;

[0016] (3) 在光电传感器曝光过程中,重复步骤2若干次,最终在曝光结束得到一幅荧光图像,其中包含N个荧光光子图像,然后对荧光信号图像进行处理分析。

[0017] 优选的,当荧光光束处于两组透镜的交界处时,激发光处于关闭状态;当荧光光束完全位于某一组共轭透镜的通光孔径内时,激发光处于打开状态。

[0018] 在一个曝光周期内,需要共振扫描振镜循环扫描若干周期;对于同一激发照明图案,在一个曝光周期内对应的荧光信号在光电传感器靶面的同一部分进行积分,最终曝光结束后在光电传感器上同时得到N个荧光光子图像,分别对应N种不同的激发照明图案。曝光周期的意思是指光电传感器接收到足够的信号,可以行成一个清楚的图像。

[0019] 荧光光束聚焦在共振扫描振镜镜面上,并且共振扫描振镜镜面处于共轭透镜组的焦点处。

[0020] 该一种多照明模式的荧光信号测量方法的应用,当照明图案为不同相位的X和Y方向条纹时,该测量方法用于荧光单分子定位测量。当照明图案为不同方向,且每个方向包含不同相位的若干条纹时,该测量方法用于结构光照明显微成像。

[0021] 本发明提出了一种多照明模式的荧光信号测量方法和装置,即激发光使用不同相位的照明图案进行激发,同时不同相位的照明图案和光源快速切换,实现不同相位的图像同幅图显示,然后对单分子在不同照明图案下的亮度计算其相对于照明条纹的相位,再通过相位对位置进行解析,从而实现更高的定位精度和更快的成像速度。利用该技术可以实

现对单分子在若干不同照明模式下的荧光信号测量,同时将荧光分子自身的漂白等因素的影响降至最低。使用这种方法,结合不同相位的条纹状照明模式,能够实现对于单分子的干涉测量,相比以往的定位方法具有精度高且不受单分子闪烁漂白的的影响等优点。

[0022] 本发明提供一种多照明模式的荧光信号测量装置及其测量方法和应用,基于不同相位下照明激发图案激发和时序控制,有效消除单分子亮度闪烁造成的误差、提高了信号信噪比、降低了荧光染料易漂白等影响。

[0023] 本发明对比已有技术具有以下显著优点:

[0024] (1) 本测量方法中,对于样品在不同照明激发图案下的荧光信号测量,能够有效消除样品自身变化以及单分子荧光闪烁造成的影响。

[0025] (2) 本测量方法中,基于不同相位下照明激发图案激发,能够显著提高单分子定位精度,同时提高超分辨显微成像的分辨能力。

附图说明

[0026] 图1为本发明一种多照明模式的荧光信号测量装置的示意图;

[0027] 图2为本发明中一种多照明模式的荧光信号测量图像采集流程示意图;

[0028] 图3为本发明中一种多照明模式的荧光信号测量图像处理流程示意图;

[0029] 图4为本发明中照明激发系统产生的不同方向和相位的激发干涉照明条纹图案;

[0030] 图5为本发明中光电传感器靶面示意图;

[0031] 图6为本发明中一幅荧光图像中包含六个荧光子图像示意图;

[0032] 图7为本发明得到的荧光信号图像和传统荧光信号图像对比示意图;

[0033] 图8为本发明得到的荧光信号图像和传统荧光信号图像分辨率对比示意图。

[0034] 其中:1-激光器;2-声光调制器;3-第一1/2波片;4-检偏器;5-第一电光调制器;6-第一偏振分光棱镜;7-第二1/2波片;8-第二电光调制器;9-第一扩束镜;10-第二偏振分光棱镜;11-第一反射镜;12-第三1/2波片;13-第四1/2波片;14-第二反射镜;15-第三反射镜;16-第四反射镜;17-第五反射镜;18-第五1/2波片;19-第三电光调制器;20-第二扩束镜;21-第三偏振分光棱镜;22-第六反射镜;23-第六1/2波片;24-第七1/2波片;25-第六反射镜;26-第七反射镜;27-第八反射镜;28-第四偏振分光棱镜;29-第一透镜;30-二向色分光镜;31-物镜;32-样品;33-第二透镜;34-光阑;35-第三透镜;36-第四透镜;37-共振扫描振镜;38-第五透镜组;39-第六透镜组;40-光电传感器;41-信号控制处理系统;42-多照明激发系统;43-荧光成像系统。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0036] 本发明的基本思想是基于照明激发图案激发和荧光信号接收时序控制,实现单分子荧光信号的高精度定位。

[0037] 下面结合附图以实际的单分子荧光信号的测量为例,对本发明进行详细的说明。

[0038] 如图1所示,一种多照明模式的荧光信号测量装置,结构为:

[0039] 包括多照明激发系统42、荧光成像系统43和信号控制处理系统41;其中多照明激发系统42用于生成X和Y方向不同相位的多照明激发图案,对样品进行激发;荧光成像系统

43用于收集和扫描不同相位激发照明图案激发产生的荧光子图像,使得在一幅荧光图像中包含N幅荧光子图像;信号控制处理系统41用于控制多照明激发系统42的激发光闭合、调制器件的相位变换和共振扫描振镜的扫描以及各部分顺序、快速的切换;还包括荧光图像的处理。

[0040] 其中,多照明激发系统42包括激光器1,激光器1的光路上依次设有声光调制器2、第一1/2波片3、检偏器4、第一电光调制器5、第一偏振分光棱镜6;

[0041] 光束经过第一偏振分光棱镜6分成两个光路即光路A和光路B,

[0042] 光路A依次设有第二1/2波片7、第二电光调制器8、第一扩束镜、第二偏振分光棱镜10;第二偏振分光棱镜10分有两个光路:第一光路上依次设有第一反射镜11、第三1/2波片12、第三反射镜15;第二个光路上依次设有第四1/2波片13、第二反射镜14;两个光路然后均依次通过第四反射镜16、第五反射镜17;

[0043] 光路B依次设有第五1/2波片18、第三电光调制器19、第二扩束镜20、第三偏振分光棱镜21;第三偏振分光棱镜21分有两个管理,第一光路上依次设有第六反射镜22、第六1/2波片23、第七反射镜26;第二个光路上依次设有第七1/2波片24、第六反射镜25;两个光路然后均依次通过第八反射镜27;

[0044] 第五反射镜17和第五反射镜17的反射光路分别进入第四偏振分光棱镜28;第四偏振分光棱镜28的出光路上设有第一透镜29;第一透镜29的光路进入荧光成像系统43的二向色分光镜30。

[0045] 荧光成像系统43由物镜31、二向色分光镜30、第二透镜33、光阑34、第三透镜35、第四透镜36、共振扫描振镜37、第五透镜组38、第六透镜组39和光电传感器40组成;二向色分光镜30、物镜31、样品32在同一光路上;二向色分光镜30的分光路上依次设有第二透镜33、光阑34、第三透镜35、第四透镜36、共振扫描振镜37;共振扫描振镜37的另外一光路上依次设有第五透镜组38、第六透镜组39和光电传感器40;其中第五透镜组38和第六透镜组39各包含六个分透镜,六个分透镜用于不同相位下的荧光信号收集。

[0046] 信号控制处理系统41控制激光器1发出激发光,经过声光调制器2控制激发光的光强输出,经过第一1/2波片3和检偏器4改变激发光的偏振方向,然后第一电光调制器5调制激发光的偏振方向,并根据偏振方向的不同由第一偏振分光棱镜6在两个不同的光路A和B之间切换。

[0047] 其中激发光在光路A中经过第二1/2波片7、第二电光调制器8改变激发光的偏振方向以及p-与s-光之间的相位差,经第一扩束镜9扩束,然后通过第二偏振分光棱镜10分为两个振动方向不同的激发子光束a和b。激发子光束a和b分别经过第一反射镜11、第三1/2波片12、第四反射镜16和第四1/2波片13、第二反射镜14、第三反射镜15,然后通过第五反射镜17、第四偏振分光棱镜28、第一透镜29、二向色分光镜30和物镜31聚焦在样品32上发生干涉,生成X方向的激发干涉照明条纹图案M1(如图4)。激发干涉照明条纹图案M1激发样品32发出荧光信号,经物镜31、二向色分光镜30、第二透镜33、光阑34、第三透镜35和第四透镜36;成像在共振扫描振镜37的镜面之上,然后通过共振扫描振镜37进行扫描,然后通过对应的第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜。然后荧光信号汇聚在光电传感器40靶面位置N1(如图5)处,对荧光信号进行积分;共振扫描振镜37扫描的荧光光束处于第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜的边缘处时,信号控制处理系统41控制光源1关闭。

[0048] 信号控制处理系统41控制产生X方向的激发干涉照明条纹图案M2,激发干涉照明条纹图案M2激发样品32发出荧光信号,经物镜31、二向色分光镜30、第二透镜33、光阑34、第三透镜35和第四透镜36;成像在共振扫描振镜37的镜面之上,然后通过共振扫描振镜37进行扫描,然后通过对应的第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜。然后荧光信号汇聚在光电传感器40靶面位置N2处,对荧光信号进行积分;共振扫描振镜37扫描的荧光光束处于第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜的边缘处时,信号控制处理系统41控制光源1关闭。

[0049] 信号控制处理系统41控制产生X方向的激发干涉照明条纹图案M3,激发干涉照明条纹图案M3激发样品32发出荧光信号,经物镜31、二向色分光镜30、第二透镜33、光阑34、第三透镜35和第四透镜36;成像在共振扫描振镜37的镜面之上,然后通过共振扫描振镜37进行扫描,然后通过对应的第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜。然后荧光信号汇聚在光电传感器40靶面位置N3处,对荧光信号进行积分;共振扫描振镜37扫描的荧光光束处于第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜的边缘处时,信号控制处理系统41控制光源1关闭。

[0050] 信号控制处理系统41控制光源1打开产生激发光,激发光在另一个光路B中经过第五1/2波片18、第三电光调制器19改变激发光的偏振方向以及p-与s-光之间的相位差,经第二扩束镜20扩束,然后通过第三偏振分光棱镜21分为两个振动方向不同的激发子光束c和d。激发子光束c和d分别经过第六反射镜22、第六1/2波片23、第八反射镜27和第七1/2波片24、第六反射镜25、第七反射镜26,然后通过第四偏振分光棱镜28、第一透镜29、二向色分光镜30和物镜31聚焦在样品32上发生干涉,生成Y方向的激发干涉照明条纹图案M4。

[0051] 激发干涉照明条纹图案M4激发样品32发出荧光信号,经物镜31、二向色分光镜30、第二透镜33、光阑34、第三透镜35和第四透镜36;成像在共振扫描振镜37的镜面之上,然后通过共振扫描振镜37进行扫描,然后通过对应的第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜。然后荧光信号汇聚在光电传感器40靶面位置N4处,对荧光信号进行积分;共振扫描振镜37扫描的荧光光束处于第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜的边缘处时,信号控制处理系统41控制光源1关闭。

[0052] 信号控制处理系统41控制产生Y方向的激发干涉照明条纹图案M5,激发干涉照明条纹图案M5激发样品32发出荧光信号,经物镜31、二向色分光镜30、第二透镜33、光阑34、第三透镜35和第四透镜36;成像在共振扫描振镜37的镜面之上,然后通过共振扫描振镜37进行扫描,然后通过对应的第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜。然后荧光信号汇聚在光电传感器40靶面位置N5处,对荧光信号进行积分;共振扫描振镜37扫描的荧光光束处于第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜的边缘处时,信号控制处理系统41控制光源1关闭。

[0053] 信号控制处理系统41控制产生Y方向的激发干涉照明条纹图案M6,激发干涉照明条纹图案M6激发样品32发出荧光信号,经物镜31、二向色分光镜30、第二透镜33、光阑34、第三透镜35和第四透镜36;成像在共振扫描振镜37的镜面之上,然后通过共振扫描振镜37进行扫描,然后通过对应的第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜。然后荧光信号汇聚在光电传感器40靶面位置N6处,对荧光信号进行积分;共振扫描振镜37扫描的荧光光束处于第五透镜组38和第六透镜组39下对应的分透镜的边缘处时,信号控制处理系统41控制

光源1关闭。如此往复,一个共振扫描振镜37扫描循环周期(如图2)完成。六个条纹循环为一个周期的时间,以每个条纹曝光时间为 $20\mu\text{s}$ 为例也就是振镜单向扫描循环一次的时间是 $125\mu\text{s}$ 。

[0054] 在一个曝光周期内,包含扫描循环共振扫描振镜37扫描若干次,对于同一种激发干涉条纹图案,其对应的荧光信号在光电传感器40靶面的对应部分进行积分。最终在一个曝光周期内每幅荧光图像中能够得到六个荧光子图像(如图6),分别对应六种不同的激发干涉条纹图案。以光电传感器40的曝光时间为 100ms 为例,振镜将进行400个扫描循环,实现每个条纹下信号积分800次。

[0055] 信号控制处理系统41根据得到的图像进行信号处理(如图3所示)。首先根据得到的荧光图像,通过一个单分子在每幅图像中六个子图像的亮度,根据二维高斯拟合计算出单分子的粗略位置以及每个单分子所在位置的照明条纹的相位信息,通过这两种数据将相位与中心位置进行配准、计算得到单分子的精确位置信息(如图8)。

[0056] X方向不同相位下发射光子的概率:

$$[0057] \quad p(x; P) = \begin{cases} \left(\sin\left(P - \frac{2}{3}\pi\right) + 1 \right) / 3 & (x = 1) \\ (\sin(P) + 1) / 3 & (x = 2) \\ \left(\sin\left(P - \frac{2}{3}\pi\right) + 1 \right) / 3 & (x = 3) \end{cases}$$

[0058] Y方向不同相位下发射光子的概率:

$$[0059] \quad p(y; P) = \begin{cases} \left(\sin\left(P - \frac{2}{3}\pi\right) + 1 \right) / 3 & (y = 1) \\ (\sin(P) + 1) / 3 & (y = 2) \\ \left(\sin\left(P - \frac{2}{3}\pi\right) + 1 \right) / 3 & (y = 3) \end{cases}$$

$$[0060] \quad \text{Fisher信息: } I_x = E \left[\left(\frac{\partial \log(p(x; P))}{\partial P} \right)^2 \right]; \quad I_y = E \left[\left(\frac{\partial \log(p(y; P))}{\partial P} \right)^2 \right]$$

[0061] 克拉美罗下界(CLRB):

$$[0062] \quad \text{CRLB}_{x,y} = \frac{\lambda}{2\sqrt{2\pi} * N.A. * \sqrt{N}}$$

[0063] 其中 λ 为激发光的波长,NA为物镜的数值孔径,N为采集到的总的光子数。

[0064] 此实施例通过一系列的措施实现了荧光信号的高精度定位,如图4和图5所示,可以看出本发明提供的荧光信号测量装置和方法,以激发干涉条纹图案激发荧光信号,实现同步和数据采集,与常规定位方法相比(如图7),最大化避免因荧光分子闪烁、漂白、发光周期短导致的定位误差,保证超高精度定位信息的获取。

[0065] 以上结合附图对本发明的具体实施方式作了说明,但这些说明不能被理解为限制了本发明的范围,本发明的保护范围由随附的权利要求书限定,任何在本发明权利要求基础上进行的改动都是本发明的保护范围。

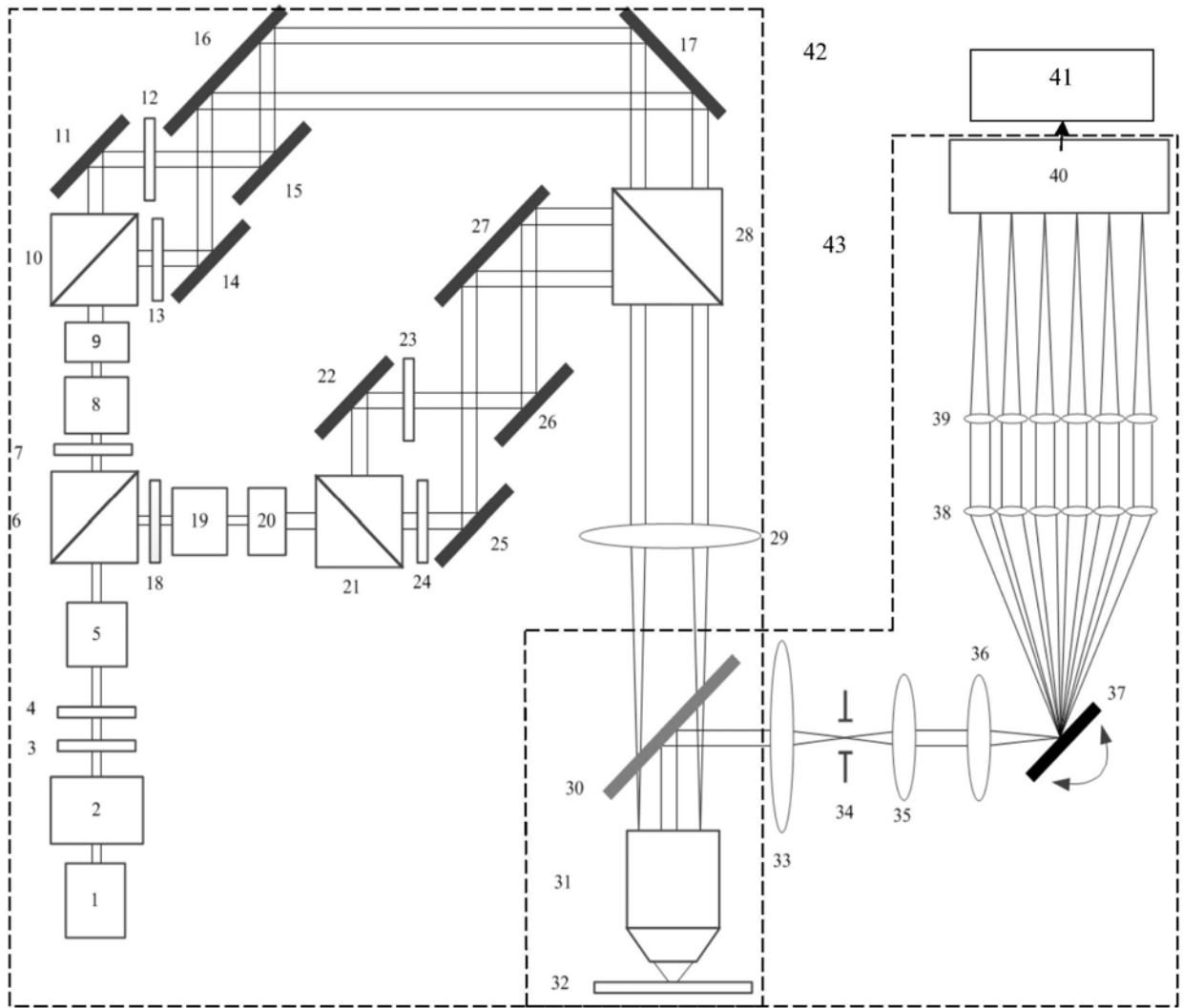


图1

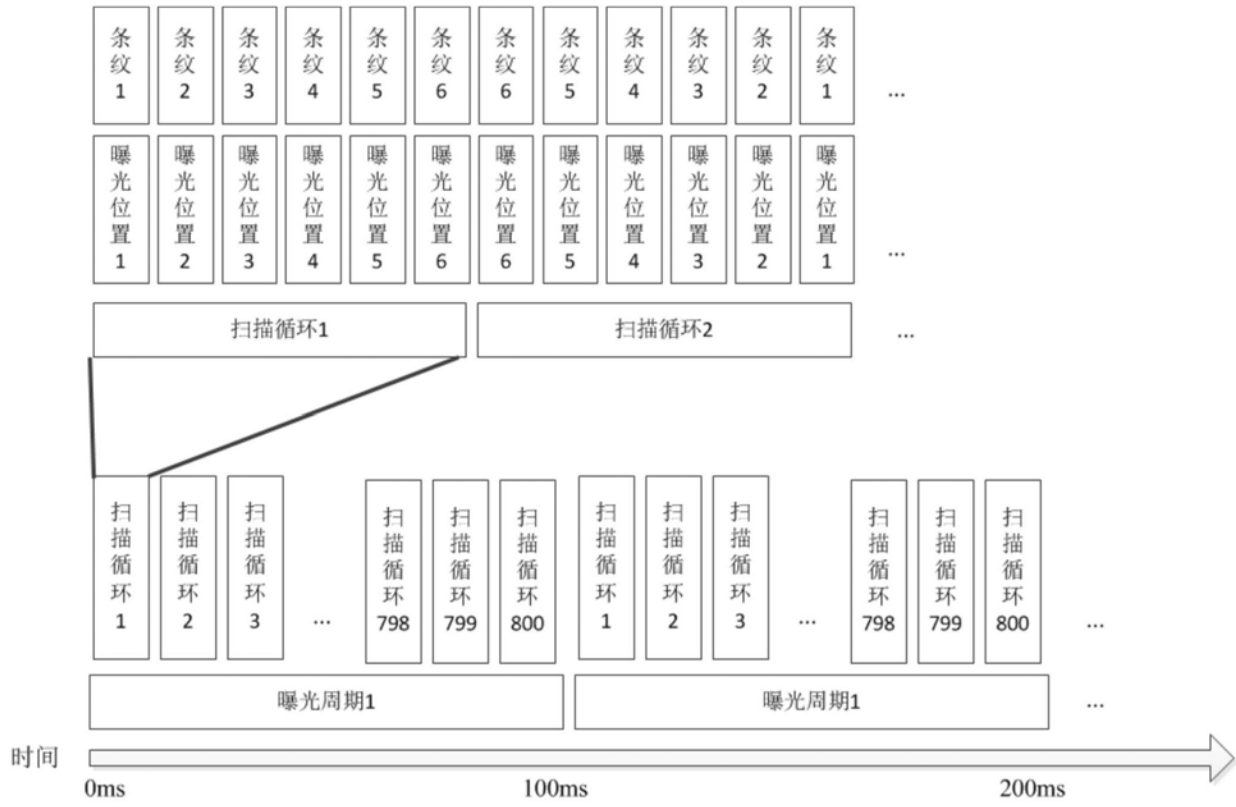


图2

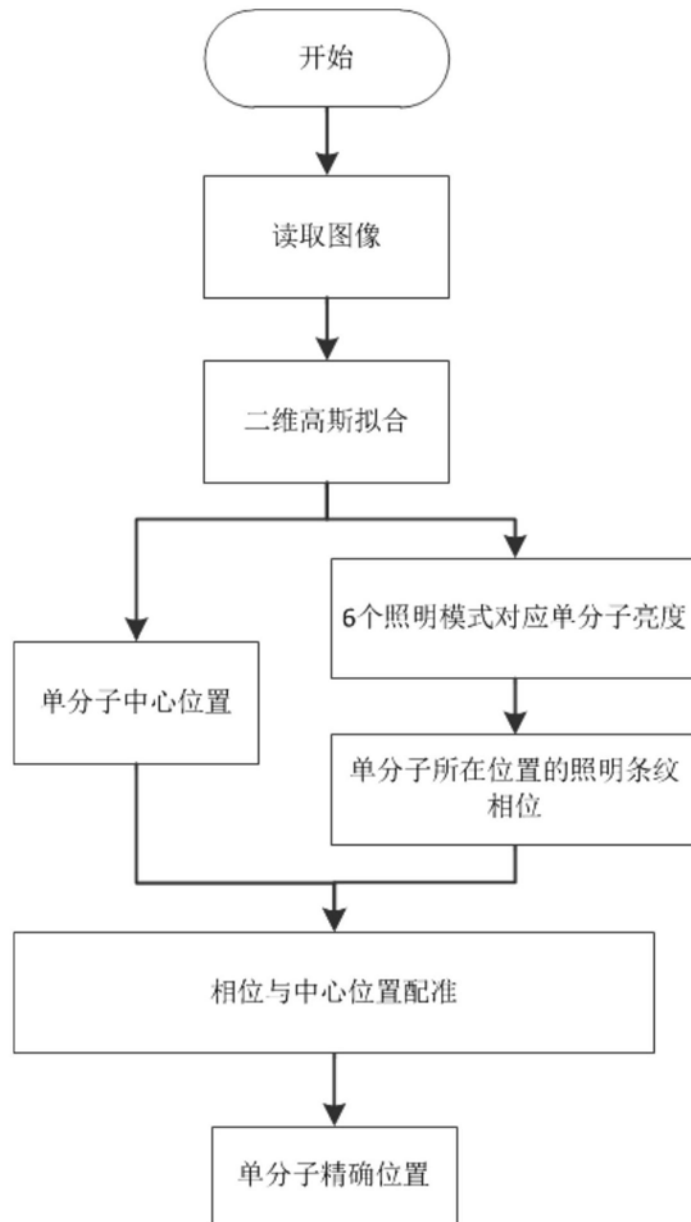


图3

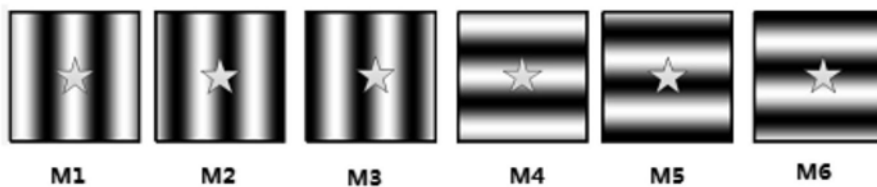


图4

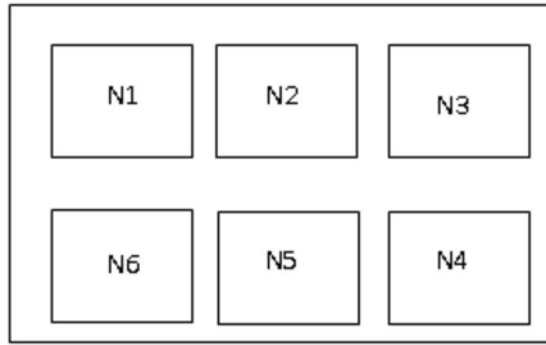


图5

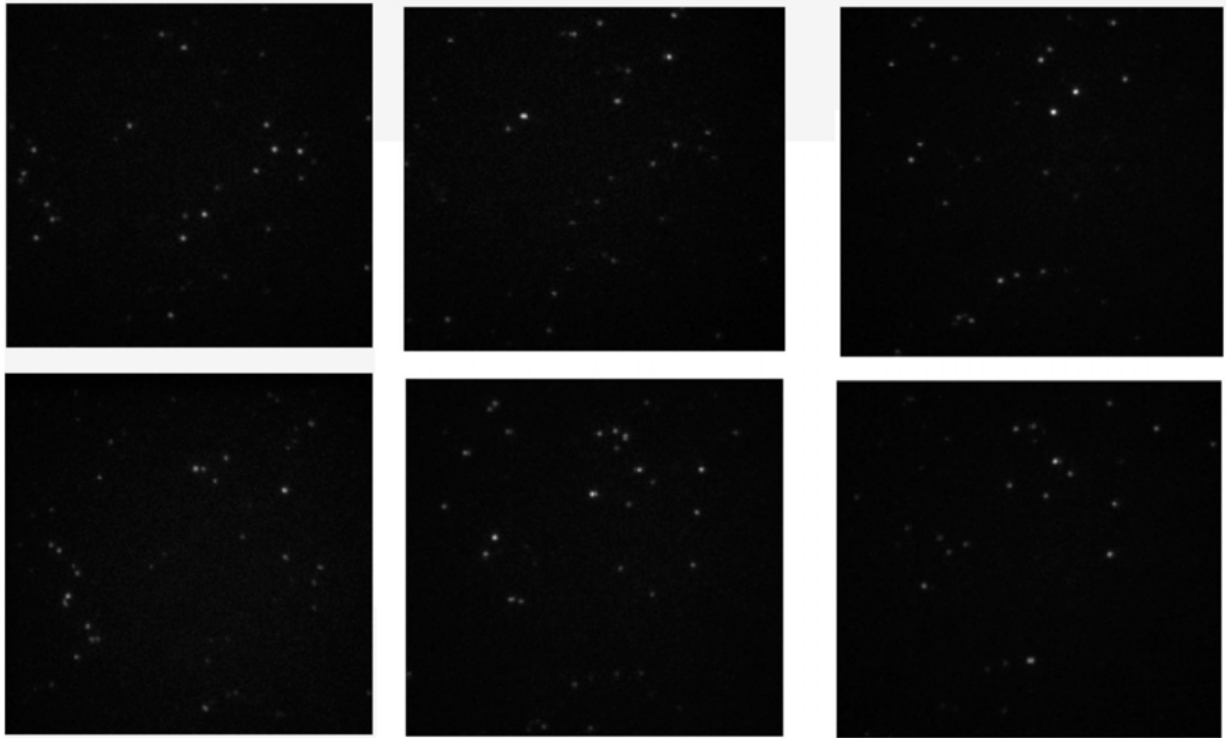


图6

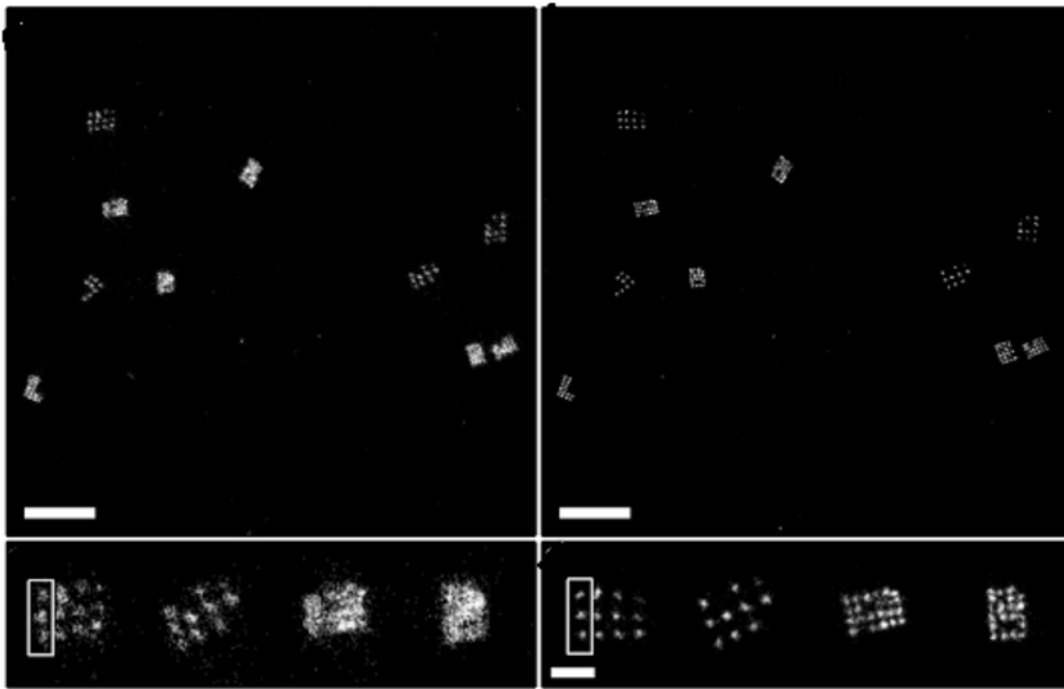


图7

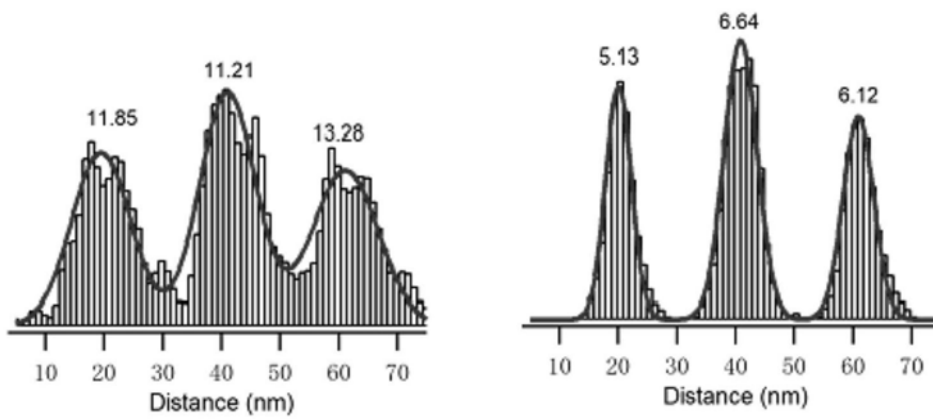


图8